



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Analytik und Testung von Fraktionen aus *Dryopteris filix-mas*

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Katharina Dvorak
Matrikel-Nummer:	a0200594
Studienrichtung:	A 449 Diplomstudium Pharmazie
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Dr. Gottfried Reznicek

Wien, im Juni 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Diplomarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Univ. Prof. Dr. V. Dirsch, die mir den Arbeitsplatz am Department für Pharmakognosie der Universität Wien zur Verfügung gestellt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinem Diplomarbeitsbetreuer Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. G. Reznicek, für die interessante Themenstellung und die hervorragende fachliche Betreuung während der praktischen Arbeit sowie bei der Erstellung der Diplomarbeit.

Weiters möchte ich mich bei Frau Univ. Prof. Dr. S. Glasl-Tazreiter und Herrn Univ. Prof. Dr. J. Jurenitsch für die fachlichen Ratschläge und Anregungen bedanken.

Bei meinen Studienkolleginnen Bettina Füreder und Diana Gligor möchte ich mich für die schöne gemeinsame Studienzeit bedanken.

Meinem Freund Horst Orsolits und meiner Familie danke ich für die Unterstützung und Motivation während des gesamten Studiums.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material	3
2.1 <i>Dryopteris filix-mas</i>	3
3. Methoden	5
3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	5
3.2 Festphasenextraktion (SPE)	7
3.3 Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)	8
3.4 Gaschromatographie gekoppelt mit MS (GC-MS)	10
3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	12
3.6 Semipräparative HPLC	13
3.7 Pharmakologische Untersuchungen	14
3.7.1 Luciferase-Zelltest	14
4. Praktischer Teil	16
4.1 Dichlormethanextrakt-Herstellung	16
4.2 Chlorophyll-Abtrennung	17
4.2.1 Überprüfung der Chlorophyll-Abtrennung mittels DC	18
4.3 Fraktionierung des gereinigten Extraktes mittels Festphasenextraktion	19
4.4 Charakterisierung der 100 % Fraktion	21
4.4.1 Überprüfung mittels GC-MS	21
4.4.2 Überprüfung mittels HPLC	27
4.4.3 Charakterisierung mittels LC-MS	29
4.4.4 DC Überprüfung der Phloroglucinole	42

4.5	Subfraktionierung der 100 % MeOH-Fraktion mittels semipräparativer HPLC	44
5.	Pharmakologische Testung der Subfraktionen	54
5.1	PPAR	54
5.2	NFκB	55
5.3	PPAR-Test	56
5.4	NFκB-Test	56
5.5	Auswertung der Messungen	57
6.	Ergebnisse und Diskussion	59
7.	Zusammenfassung	60
8.	Abstract	61
9.	Literaturverzeichnis	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Parameter für die DC-Überprüfung der Chlorophyllabtrennung .	6
Tab. 2	Parameter für die DC-Überprüfung der Phloroglucinole	6
Tab. 3	Parameter für die Festphasenextraktion	7
Tab. 4	Parameter für die Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS	8
Tab. 5	Parameter für die Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS (Fortsetzung).....	9
Tab. 6	Parameter der MS-Methoden	9
Tab. 7	Parameter für die Gaschromatographie gekoppelt mit MS.....	11
Tab. 8	Parameter für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	12
Tab. 9	Parameter für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Fortsetzung).....	13
Tab. 10	Parameter für die semipräparative Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie	13
Tab. 11	Parameter für die semipräparative Hochleistungsflüssigkeits- chromatographie (Fortsetzung).....	14
Tab. 12	Parameter für den Luciferase-Zelltest	15
Tab. 13	Zusammenfassung der Ergebnisse der Datenbanksuche	21
Tab. 14	Inhalte der zu untersuchenden Substanzen	53
Tab. 15	Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung	57

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Überblick der geplanten Arbeitsschritte der Diplomarbeit.....	2
Abb. 2 <i>Dryopteris filix-mas</i> [4].....	3
Abb. 3 <i>Dryopteris filix-mas</i> mit Sori [5]	4
Abb. 4 elektrische Drogenmühle.....	16
Abb. 5 aus Dichlormethan-Extrakt abgetrenntes Chlorophyll.....	17
Abb. 6 grünlich-gelb gefärbtes Filtrat nach Chlorophyll-Abtrennung	17
Abb. 7 DC-Überprüfung der Chlorophyll-Abtrennung bei UV 366 nm Chlorophyll-Zonen rot markiert	18
Abb. 8 Fraktionierung mittels Festphasenextraktion	19
Abb. 9 30 %, 70 % und 100 % MeOH-Fractionen nach SPE.....	20
Abb. 10 TIC der 100 % MeOH-Fraktion.....	21
Abb. 11 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 1	22
Abb. 12 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 2	22
Abb. 13 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 3	23
Abb. 14 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 4	23
Abb. 15 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 5	24
Abb. 16 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 6	24
Abb. 17 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 7	25
Abb. 18 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 8	25
Abb. 19 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 9	26
Abb. 20 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 10	26
Abb. 21 ELSD-Signal der 100 % MeOH-Fraktion	27
Abb. 22 HPLC Analyse der 100 % MeOH-Fraktion bei verschiedenen Wellenlängen.....	28
Abb. 23 UV-Spektren der Peaks 1 und 2 der 100 % MeOH-Fraktion bei 254 nm.....	28

Abb. 24 Basispeak Chromatogramm der 100 % MeOH-Fraktion im positiv Modus und negativ Modus; UV-Chromatogramm bei 190-800 nm	30
Abb. 25 HPLC-Analyse der 100 % MeOH-Fraktion mit DAD	30
Abb. 26 Negative ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR1	31
Abb. 27 Positive ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR1	31
Abb. 28 Flavaspidsäure AB (MW = 418,1)	32
Abb. 29 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure AB	32
Abb. 30 Negative ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR2	33
Abb. 31 Positive ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR2	33
Abb. 32 Flavaspidsäure AB (MW = 418,1)	34
Abb. 33 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure AB	34
Abb. 34 Negative ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR3	35
Abb. 35 Positive ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR3	35
Abb. 36 Phloraspin BB (MW = 432,5)	36
Abb. 37 Fragmentierungsmöglichkeiten von Phloraspin BB	36
Abb. 38 Negative ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR4	37
Abb. 39 Positive ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR4	37
Abb. 40 Flavaspidsäure BB (MW = 446,5)	38
Abb. 41 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure BB	38
Abb. 42 Desaspidin (MW = 446,5)	39
Abb. 43 Fragmentierungsmöglichkeiten des Desaspidin	39
Abb. 44 Negative ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR5	40
Abb. 45 Positive ion mode ESI-IT-MS ⁿ (n=1-2) spectra of CNR5	40
Abb. 46 Phloraspin BB (MW = 432,5)	41
Abb. 47 Fragmentierungsmöglichkeiten von Phloraspin BB	41
Abb. 48 DC-Überprüfung der Phloroglucinoles mit Echtrotsalz bei Tageslicht	43

Abb. 49 DC-Überprüfung der Phloroglucinole mit Echtblausalz bei Tageslicht	43
Abb. 50 Einteilung der Subfraktionen 1, 2, 2-3, 3 und 4	44
Abb. 51 Einteilung der Subfraktionen 5 und 6.....	45
Abb. 52 HPLC Analyse der Subfraktion 1 bei verschiedenen Wellenlängen.....	46
Abb. 53 ELSD-Signal der Subfraktion 1.....	46
Abb. 54 HPLC Analyse der Subfraktion 2 bei verschiedenen Wellenlängen.....	47
Abb. 55 ELSD-Signal der Subfraktion 2.....	47
Abb. 56 HPLC Analyse der Subfraktion 2-3 bei verschiedenen Wellenlängen.....	48
Abb. 57 ELSD-Signal der Subfraktion 2-3	48
Abb. 58 HPLC Analyse der Subfraktion 3 bei verschiedenen Wellenlängen.....	49
Abb. 59 ELSD-Signal der Subfraktion 3.....	49
Abb. 60 HPLC Analyse der Subfraktion 4 bei verschiedenen Wellenlängen.....	50
Abb. 61 ELSD-Signal der Subfraktion 4.....	50
Abb. 62 HPLC Analyse der Subfraktion 5 bei verschiedenen Wellenlängen.....	51
Abb. 63 ELSD-Signal der Subfraktion 5.....	51
Abb. 64 HPLC Analyse der Subfraktion 6 bei verschiedenen Wellenlängen.....	52
Abb. 65 ELSD-Signal der Subfraktion 6.....	52
Abb. 66 Graphische Darstellung der pharmakologischen Untersuchungen (Aktivierung von PPAR α).....	58
Abb. 67 Graphische Darstellung der pharmakologischen Untersuchungen (Aktivierung von PPAR γ).....	58

Abkürzungsverzeichnis

amu	atomar mass units
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DAD	Diode Array Detector
DC	Dünnschichtchromatographie
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
EBS	Echtblausalz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced-green-fluorescence-protein
EI	Elektronenstoßionisation
ELSD	Evaporative Light Scattering Detector
ERS	Echtrotsalz
eV	Elektronenvolt
FBS	Fetal bovine serum
GC	Gaschromatographie
HEK	Human embryonic kidney
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IKK	I κ B Kinase-Komplex
LC	Liquid Chromatography, Flüssigchromatographie
Luc	Luciferase
MS	Massenspektrometrie
NF κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
PBS	Phosphat buffered saline
PPAR α,β,γ	Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor Alpha, Beta, Gamma
PPRE	Peroxisome Proliferator Response Element
RS	Rapid Seperation
SPE	Solid Phase Extraction, Festphasenextraktion
TIC	Totalionenstrom

1. Einleitung und Problemstellung

Farne haben schon seit langer Zeit in der Volksmedizin eine große Bedeutung. Früher wurden Zubereitungen aus dem Wurzelstock, innerlich verabreicht, als Antihelminthikum verwendet. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite kam es sehr häufig zu Intoxikationen, daher ist diese Anwendung heutzutage obsolet. Die getrockneten Farnwedel werden aber heute noch äußerlich angewendet als Bestandteil von Salben zur Behandlung von Fuß- und Beinschmerzen, schmerzhafter Ballenbildung und Durchblutungsstörungen. Die Krautwedel sollen als Kissen aufgelegt gegen Rheumatismus, schmerzlindernd bei Hexenschuss und Ischias wirken [1].

Im Rahmen einer Dissertation [2] am Institut für Pharmakognosie der Universität Wien, wurde eine „VOLKSMED – Datenbank“ erstellt. Dabei zeigte sich, dass der Farn, als äußerliche Anwendung in Form von Umschlägen an erster Stelle steht, bei der Behandlung von Rheuma, Gicht und Schmerzen des Bewegungsapparates. Diese volksmedizinische Anwendung sollte wissenschaftlich untermauert werden. Jedoch ergab sich die Problematik, dass es in Österreich über 50 verschiedene Farnarten gibt und in der volksmedizinischen Anwendung keine Unterscheidung erfolgt. Die Farnart *Dryopteris filix-mas* ist sehr gut bestimmbar und leicht von anderen Arten unterscheidbar. Daher wurde *Dryopteris filix-mas* in vorangegangenen Diplomarbeiten zur Untersuchung herangezogen. Die letzteren Ergebnisse zeigten, dass eine Dichlormethanextrakt-Herstellung und eine anschließende bioaktivitätsgeleitete Fraktionierung als die Methode der Wahl bezeichnet werden kann, um rasch und zielgerichtet wirksame Fraktionen zu finden. Zur vorher begleitenden Überprüfung der Aktivität etablierte sich der Luciferase-Zelltest, als geeignetes zelluläres Testsystem zur Testung der antiphlogistischen Wirksamkeit. In vorangegangenen Diplomarbeiten [7, 8, 16, 17] wurde ein Dichlormethanextrakt durch Festphasenextraktion (SPE) in 3 Unterfraktionen weiter aufgetrennt.

Die Ergebnisse der pharmakologischen Testungen ergaben in vorangegangenen Diplomarbeiten, dass die „30 % MeOH-Fraktion“ kaum antiphlogistische Wirkung zeigt. Aber die „70 % MeOH-Fraktion“ und die „100 % MeOH-Fraktion“ eine sehr hohe antiphlogistische Wirkung in den Testsystemen ergaben.

Dementsprechend war es Ziel dieser Diplomarbeit, eine größere Menge dieser „100 % MeOH-Fraktion“ herzustellen. Diese sollten dann mittels präparativer HPLC weiter fraktioniert werden, um dann einzelne Subfraktionen zu erhalten und diese auf ihre möglichen antiphlogistischen Inhaltsstoffe zu untersuchen.

Abb. 1 zeigt einen kurzen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte, die in dieser Diplomarbeit durchgeführt werden sollten.

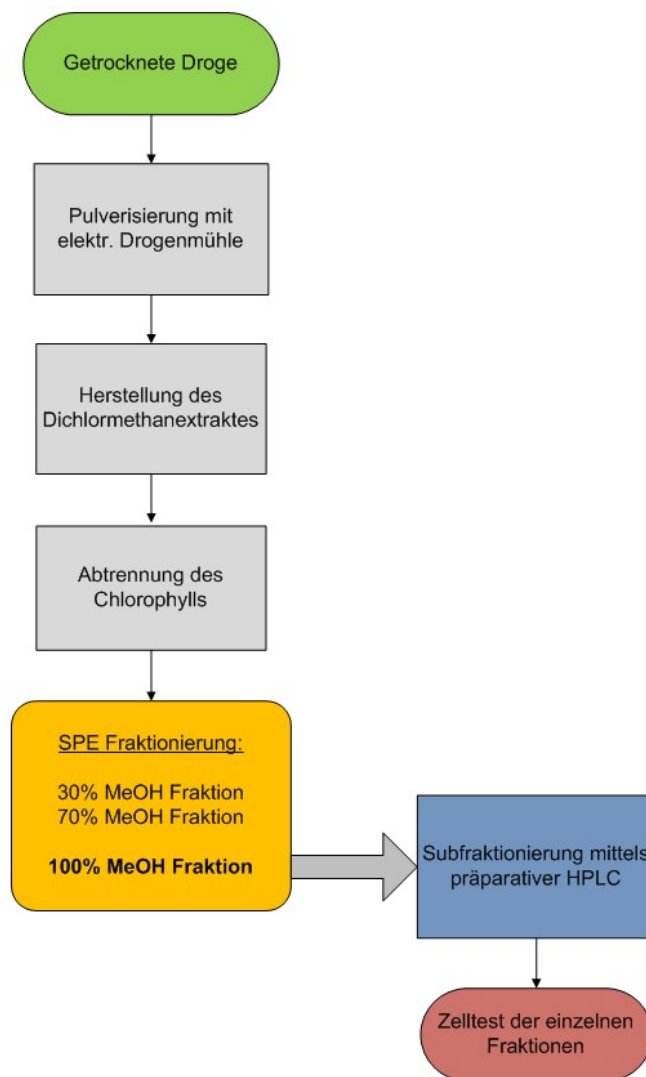


Abb. 1 Überblick der geplanten Arbeitsschritte der Diplomarbeit

2. Material

Für die vorliegende Diplomarbeit wurde Drogenmaterial von der Aufsammlung Sommer 2006 Ebenwaldhöhe in Niederösterreich verwendet. Belegexemplare liegen im Herbarium des Departments für Pharmakognosie der Universität Wien auf.

2.1 *Dryopteris filix-mas*

Dryopteris filix-mas (L.) SCHOTT (Echter Wurmfarne), siehe Abb. 2



Abb. 2 *Dryopteris filix-mas* [4]

Familie: Dryopteridaceae

Unterfamilie: Dryopteridoideae

Gattung: Dryopteris

Sonstige Bezeichnungen:

Bandwurmkraut, Farnkraut, Farnmännlein, Federfarn, Flohkraut, Gemeiner Wurmfarne, Wanzenkraut,...[1].

Verbreitung:

Dryopteris filix-mas ist weit verbreitet in den gemäßigten Zonen Europas, sowie in Asien und Amerika. Bevorzugt wächst er in schattigen Zonen von Wäldern und auf kalkfreien Böden [1].

Botanische Beschreibung:

30 bis 140 cm hohe, ausdauernde Pflanze mit kurzem, dickem, aufsteigendem Rhizom, das dicht mit Blattresten besetzt ist. Am Ende mit trichterförmig angeordneten Blättern. Blattstiel 6 bis 30 cm lang und bis 5 mm dick. Blattstiel nur am Grund dicht, sonst wie die Blattspindel spärlich mit braunen Spreuschuppen besetzt. Blätter einfach gefiedert, oberseits dunkelgrün, unterseits blasser. Die Fiedern sind tief fiederspaltig mit gesägten Abschnitten. An den Fiederchen des mittleren und oberen Teils der Blätter sind mindestens 3, meist 5 bis 6 Sori, dem Mittelnerv genähert, vorhanden, siehe Abb. 3. Diese sind klein, rundlich und von nierenförmigem Schleier (Indusium) bedeckt. Sporen dunkelbraun mit unregelmäßigen, gewundenen Leisten. Geruch: eigenartig [1].



Abb. 3 *Dryopteris filix-mas* mit Sori [5]

3. Methoden

In diesem Kapitel werden kurz die chromatographischen, spektroskopischen und pharmakologischen Methoden und ihre Parameter beschrieben, welche bei dieser Diplomarbeit in Verwendung waren.

3.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) zählt zu der Planarchromatographie. Diese Trennmethode basiert auf dem Prinzip, das sich die mobile Phase durch die stationäre Phase in planarer Anordnung bewegt. Kapillarkräfte bewirken die Wanderung der mobilen Phase und den Transport der einzelnen Komponenten des zu trennenden Gemisches. Die Trennung erfolgt durch unterschiedlich starke Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten mit der stationären Phase und der mobilen Phase. Das Verfahren kann zur Charakterisierung und Überprüfung von Extrakten und Fraktionen verwendet werden [3].

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die DC sowohl für die Überprüfung der Chlorophyllabtrennung des gereinigten Extraktes als auch für die Überprüfung der Phloroglucinole in der 100 % Methanol-Fraktion durchgeführt. Die dabei verwendeten Parameter werden in Tab. 1 und Tab. 2 beschrieben.

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Fertigplatten Merck®, Schichtdicke 0,25 mm
Mobile Phase:	Toluol/Ethylformiat/konz. Ameisensäure (5+4+1)
Trennstrecke:	8 cm
Detektion:	Naturstoffreagens A: 1 % alkoholische Lösung von Diphenyl-2-aminoethylester, mit Polyethylenglykol 400 nach besprüht

Tab. 1 Parameter für die DC-Überprüfung der Chlorophyllabtrennung

Stationäre Phase:	Kieselgel 60 F ₂₅₄ , Fertigplatten Merck®, Schichtdicke 0,25 mm
Mobile Phase:	Chloroform/Methanol (85+15)
Trennstrecke:	8 cm
Detektion:	Echtblausalz B-Reagens: 0,1 g Echtblausalz B in 20 ml dest. Wasser Echtrotsalz B-Reagens: 0,1 g Echtrotsalz B in 20 ml dest. Wasser

Tab. 2 Parameter für die DC-Überprüfung der Phloroglucinole

3.2 Festphasenextraktion (SPE)

Die Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction), ist eine Sonderform der Säulenchromatographie und beruht auf dem Adsorptionsprinzip. Es handelt sich hierbei um einen physikalischen Extraktionsprozess, der zwischen einer flüssigen und einer festen Phase, dem Sorbens, stattfindet. Die feste Phase hat eine stärkere Wechselwirkung mit bestimmten Substanzen der Probe als das Lösungsmittel, in dem die Substanzen gelöst sind. Dieses Verfahren dient häufig zur Abtrennung von störenden Begleitstoffen, wie zum Beispiel Chlorophyll, und zur Fraktionierung [3].

Die Festphasenextraktion wurde in dieser Diplomarbeit zur Fraktionierung des gereinigten Dichlormethan-Extraktes verwendet. Die verwendeten Parameter werden in Tab. 3 beschrieben.

Stationäre Phase:	Varian Mega Bond-Elut C-18, 5000 mg, 20 ml
Mobile Phase:	30 %-, 70 %- und 100 %-wässriges Methanol
Auftragemenge:	200 mg des gereinigten Extrakts in 1 ml Dichlormethan gelöst
Elutionsmenge:	je 5 Reservoirvolumina (à 20 ml)

Tab. 3 Parameter für die Festphasenextraktion

3.3 Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie (LC-MS)

Die LC-MS stellt eine Kopplung von Flüssigchromatographie, (siehe Kapitel 3.5) und Massenspektrometrie dar. Durch die Kombination dieser beiden Methoden entstand eine universelle Analysenmethode.

Die Massenspektrometrie dient dazu, organische Analytmoleküle in geeigneter Form zu ionisieren, die gebildeten Ionen nach ihrer Masse und Ladung zu trennen und sie mit Hilfe von geeigneten Detektions- und Auswertesystemen nach Masse und Häufigkeit mit Hilfe von Analysatoren qualitativ und quantitativ in Form eines Massenspektrums zu charakterisieren [3].

In dieser Arbeit wurde die LC-MS für die Charakterisierung der Substanzen aus der 100 % Methanol-Fraktion verwendet. Die verwendeten Parameter werden in Tab. 4 und Tab. 5 und Tab. 6 beschrieben.

Gerät:	Dionex UltiMate 3000 gekoppelt mit Bruker HCT, Ionenfallen-MS
Stationäre Phase:	LIChrospher® 100 RP-18, 4 x 250 mm, Korngröße 5 µm
Mobile Phase:	Methanol + Wasser, angesäuert mit Ameisensäure auf pH-Wert 2,8
Autosampler:	Ultimate 3000 RS Autosampler
Einspritzvolumen:	5 µl
Flussrate:	1 ml/min

Tab. 4 Parameter für die Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS

Gradient:	Methanol / Wasser, 50 %-100 % / 80 min
Pumpe:	UltiMate 3000 RS Pump
Detektion:	UltiMate 3000 RS DAD
Software:	Bruker Compass hystar
MS-Gerät:	Bruker HCT Ionenfallenmassenspektrometer

Tab. 5 Parameter für die Flüssigchromatographie gekoppelt mit MS (Fortsetzung)

Mode:	MS-1	MS-2: -DDA	MS-2: +DDA
Mass Range	Std/Enhanced	Std/Enhanced	Std/Enhanced
Mode:			
Ion Polarity:	On	Negative	Positive
Tune Source:			
Dry Temp (Set):	340 °C	340 °C	340 °C
Nebulizer (Set):	30,00 psi	30,00 psi	30,00 psi
Dry Gas (Set):	7,00 l/min	7,00 l/min	7,00 l/min
HV Capillary:	-4000 V	4000 V	-4000 V
Tune SPS:			
Target Mass:	500 m/z	500 m/z	500 m/z
Trap:			
Scan Begin:	100 m/z	130 m/z	100 m/z
Scan End:	2000 m/z	1000 m/z	800 m/z

Tab. 6 Parameter der MS-Methoden

3.4 Gaschromatographie gekoppelt mit MS (GC-MS)

Die Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie, (siehe Kapitel 3.3), ist eine chromatographische Methode zur Trennung von Substanzgemischen, die gasförmig oder die durch Erhitzen in den gasförmigen Zustand übergeführt werden. Die mobile Phase ist stets gasförmig, man verwendet verschiedene Gase, die eine möglichst geringe Kompressibilität und eine niedrige Viskosität aufweisen sollten. Die stationäre Phase ist flüssig und sie sollte einen niedrigen Dampfdruck, hohe thermische Beständigkeit und ein günstiges Viskositäts-Temperaturverhalten besitzen. Die zu trennenden Substanzen werden in einem beheizten Einspritzsystem (Injektor) in die Gasphase übergeführt und vom fließenden Trägergas auf die Trennsäule im Säulenofen gebracht. In der Säule kommt es dann zur Trennung der Substanzen, dann werden die getrennten Substanzen über einen Detektor analysiert [3].

In unserem Fall wurde ein Massenspektrometer zur Detektion benutzt, wodurch aussagekräftige Massenspektren der einzelnen Verbindungen erhalten werden konnten und dementsprechend Substanzvorschläge gemacht werden konnten.

Die GC-MS wurde in dieser Diplomarbeit zur Charakterisierung der 100 % Methanol-Fraktion, insbesondere für flüchtige Substanzen verwendet. Die verwendeten Parameter werden in Tab. 7 beschrieben.

Gerät:	SHIMADZU GC-MS – QP 2010
Säule:	Phenomenex ZB-5/ 60 m x 0,25 mm i.D. 0,25 µm Filmdicke
Trärgas:	Helium 5.0
Ionenquelle:	El, 70 eV, 250 °C
Temperatur:	50 °C - 270 °C Aufheizrate: 3 °C/min
Injektion:	270 °C
Einspritzvolumen:	2 µl
Scan:	40 - 500 amu
Bibliotheken:	WILEY229, NIST27, NIST147

Tab. 7 Parameter für die Gaschromatographie gekoppelt mit MS

3.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) dient zur Analyse von schwerflüchtigen, nicht flüchtigen und thermolabilen Substanzen. Voraussetzung dafür ist, dass die Analyten in der mobilen Phase löslich sind. Zur Detektion wurde ein Diode Array Detektor (DAD) verwendet. Der DAD ist ein UV/Vis-Messgerät, der das gesamte Absorptionsspektrum der eluierenden Substanz erfassen kann, das erhaltene UV/Vis Spektrum kann wichtige Hinweise zur Substanz geben [3].

In dieser Arbeit wurde die HPLC zur Überprüfung und Charakterisierung der 100 % Methanol-Fraktion verwendet. Die verwendeten Parameter werden in Tab. 8 und Tab. 9 beschrieben.

Stationäre Phase:	LiChrospher® 100 RP-18, 4 x 250 mm, Korngröße 5 µm
Mobile Phase:	Methanol + Wasser, angesäuert mit Ameisensäure auf pH 2,8
Autosampler:	SHIMADZU SIL-10 AD
Einspritzvolumen:	5 µl
Flussrate:	1 ml/min

Tab. 8 Parameter für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Gradient:	Methanol / Wasser, 50 %-100 % / 80 min
Pumpe:	SHIMADZU LC-20 AD
Detektion:	DAD, SHIMADZU SPD-M20A, 254 nm, 285 nm, 340 nm
Software:	SHIMADZU LCsolution Version 1.21 SP1

Tab. 9 Parameter für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Fortsetzung)

3.6 Semipräparative HPLC

Die HPLC wurde schon in Kapitel 3.5 beschrieben. Die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie wurde in dieser Arbeit für die weitere Fraktionierung des gereinigten Extraktes verwendet. Es wurden große Mengen aufgebracht und getrennt, dementsprechend erhielt man schneller die gewünschte Menge an Substanzen/Fractionen. Die verwendeten Parameter werden in Tab. 10 und Tab. 11 beschrieben.

Stationäre Phase:	LIChrospher® 100 RP-18, 4 x 250 mm, Korngröße 5 µm
Mobile Phase:	Methanol + Wasser, angesäuert mit Ameisensäure auf pH 2,8
Autosampler:	SHIMADZU SIL-10 AD
Einspritzvolumen:	40 µl

Tab. 10 Parameter für die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Flussrate:	1 ml/min
Gradient:	Methanol / Wasser, 50 %-100 % / 80 min
Pumpe:	SHIMADZU LC-20 AD
Detektion:	DAD, SHIMADZU SPD-M20A, 254 nm, 285 nm, 340 nm
Software:	SHIMADZU LCsolution Version 1.21 SP1

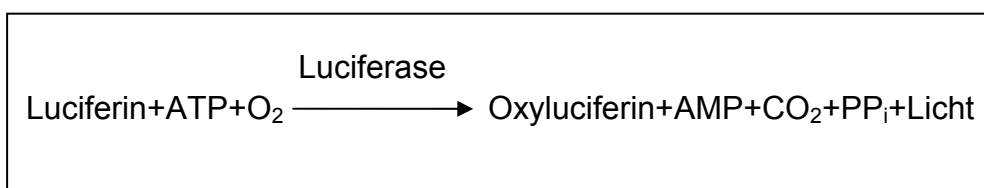
Tab. 11 Parameter für die semipräparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
(Fortsetzung)

3.7 Pharmakologische Untersuchungen

Zur Überprüfung der pharmakologischen Aktivität von Fraktionen/Subfraktionen wurde die Aktivierung von Peroxisomen-Proliferator-aktivierte-Rezeptoren-Alpha und -Gamma (PPAR α und PPAR γ) und die Rezeptorinhibierung von Nuclear Faktor κ B (NF κ B) der *Dryopteris filix-mas* Fraktionen mittels Luciferase Zelltest überprüft.

3.7.1 Luciferase-Zelltest

Luciferase katalysiert die Oxidation von Luciferin in einer ATP-abhängigen Reaktion [9]:



Ein Luciferase-Testsystem erfordert zunächst das Erstellen eines cotransfizierten DNA-Strangs im Zellkern. Zunächst wird der Promotor eines Gens, dessen Genprodukt das Target des Screenings darstellt, mit dem Luciferase-Gen gekoppelt. Da der Promotor zunächst aktiviert werden muss, stellt er nun einen selektiven Indikator für Agonisten des natürlichen Aktivators dar. Durch die Kopplung mit dem Luciferase-Gen wird nach der Aktivierung des Target-Gen-Promotors Luciferase hergestellt, woraufhin dem Testsystem zugegebenes Luciferin unter Chemilumineszenz zu Oxyluciferin umgebaut wird, das entstandene Licht kann gemessen werden. Will man Antagonisten des Targets testen, so misst man das Verblässen der Chemilumineszenz [10].

Die Parameter für den Luciferase Zelltest sind in Tab. 12 beschrieben.

Zellen:	HEK-293 Zellen HEK-293T Zellen
Medien:	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) FBS (Fetal bovine serum) BPS (Phosphat buffered saline) Trypsin-EDTA
Plasmide:	PPRE-tk3x-luc pNF κ B-luc pEGFP-C1

Tab. 12 Parameter für den Luciferase-Zelltest

4. Praktischer Teil

4.1 Dichlormethanextrakt-Herstellung

Zur Herstellung des Dichlormethanextraktes wurden zunächst 1202 g getrocknete Droge mittels elektrischer Drogenmühle, siehe Abb. 4 (Siebgröße 0,75 mm) zu Pulver vermahlen.



Abb. 4 elektrische Drogenmühle

Es wurden 200 g des Pulvers mit 2000 ml Dichlormethan versetzt und 30 min bei Raumtemperatur am Ultraschallbad extrahiert. Die so entstandene dunkelgrün gefärbte Lösung wurde filtriert. Der Filtrerrückstand wurde abermals mit 2000 ml Dichlormethan versetzt und wieder unter gleichen Bedingungen 30 min am Ultraschallbad extrahiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um eine erschöpfende Extraktion zu gewährleisten. Die Filtrate wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei ca. 45 °C zur Trockene gebracht.

Auf diese Weise wurde eine Gesamtmenge von 36,38 g Rohextrakt (3,03 % vom Ausgangsmaterial) erhalten, die zur weiteren Verarbeitung zur Verfügung stand.

4.2 Chlorophyll-Abtrennung

Es zeigte sich bereits in vorangegangenen Diplomarbeiten [6,7], dass die Komponente Chlorophyll einen großen Anteil im Inhaltsstoffmuster einnahm und bei weiteren phytochemischen und pharmakologischen Untersuchungen störte. Daher wurde im nächsten Schritt das Chlorophyll mittels Flüssig-Flüssig-Verteilung mit Dichlormethan und einer Methanol-Wasser Mischung so gut wie möglich abgetrennt.

Dazu wurden je ca. 5 g Rohextrakt in 750 ml Dichlormethan gelöst und mit der gleichen Menge einer Mischung aus Methanol-Wasser (1:1) versetzt. Es entstand ein so genanntes Zweiphasen-System, dass am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei ca. 45 °C eingeeengt wurde. Dabei fielen die Ballaststoffe und die unlösliche Begleitstoffe (v.a. Chlorophyll), siehe Abb. 5 in der Methanol-Wasser Phase aus und konnten durch anschließende Filtration entfernt werden.



Abb. 5 aus Dichlormethan-Extrakt abgetrenntes Chlorophyll

Da das grünlich-gelb gefärbte Filtrat eine Trübung aufwies, wurde eine weitere Filtration durchgeführt. Das so erhaltene Filtrat, siehe Abb. 6 wies nur noch eine leichte Trübung auf und konnte nun am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei ca. 45 °C zur Trockene gebracht werden. Somit wurden 4,76 g gereinigtes Extrakt (13,08 % vom Dichlormethan-Extrakt) erhalten.



Abb. 6 grünlich-gelb gefärbtes Filtrat nach Chlorophyll-Abtrennung

4.2.1 Überprüfung der Chlorophyll-Abtrennung mittels DC

Um die Qualität der Chlorophyll-Abtrennung zu überprüfen, wurde eine Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Dazu wurde je 1 g Rohextrakt, abgetrenntes Chlorophyll und gereinigtes Extrakt in 1 ml Dichlormethan gelöst. Es wurden je 15 µl auf eine DC-Platte aufgetragen und dünnschichtchromatographisch überprüft. Die bei der Dünnschichtchromatographie verwendeten Parameter sind in Kapitel 3.1 beschrieben.

Wie in Abb. 7 zu sehen ist, wurde im gereinigten Extrakt nur noch sehr wenig Chlorophyll nachgewiesen. Diese geringe Menge sollte bei den weiteren Untersuchungen nicht stören.

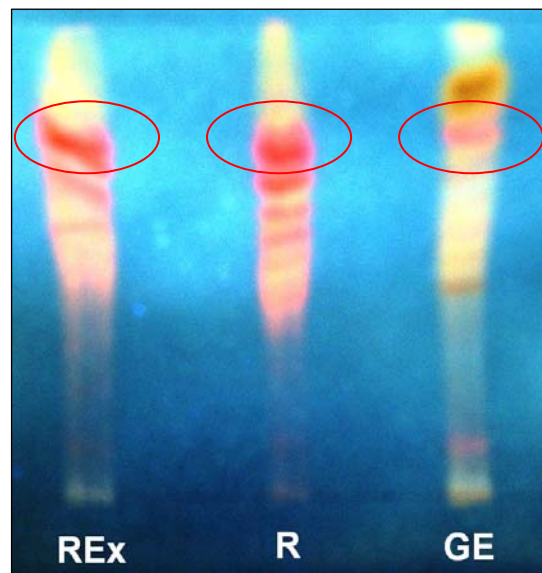


Abb. 7 DC-Überprüfung der Chlorophyll-Abtrennung bei UV 366 nm
Chlorophyll-Zonen rot markiert

REx = Rohextrakt

R = Chlorophyll

GE = Gereinigtes Extrakt

4.3 Fraktionierung des gereinigten Extraktes mittels Festphasenextraktion

Da eine weitgehende Abtrennung des Chlorophylls gelang, konnte nun eine Fraktionierung des gereinigten Extraktes durchgeführt werden. In vorangegangenen Diplomarbeiten [8] zeigte sich Methanol/Wasser als geeignetes Elutionsmittel und dass die 70 % und die 100 % Methanol-Fractionen starke antiphlogistische Wirkung zeigten.

Um mit der eigentlichen Fraktionierung beginnen zu können, mussten zuerst die Kartuschen konditioniert werden. Dazu wurden die Kartuschen dreimal mit jeweils 20 ml Methanol, dann einmal mit 20 ml destilliertem H₂O und einmal mit 20 ml 30 % Methanol gewaschen. Anschließend wurden die Kartuschen eine halbe Stunde bei 15 mbar Vakuum getrocknet. Als nächster Schritt wurden 200 mg gereinigtes Extrakt in 1 ml Dichlormethan gelöst und mittels Pipette auf die Kartusche aufgetragen. Anschließend wurde wieder eine halbe Stunde bei 15 mbar getrocknet. Dann wurde jeweils nacheinander mit 5 Reservoirvolumina (à 20 ml) 30 %-, 70 %- und 100 %-Methanol eluiert, siehe Abb. 8.



Abb. 8 Fraktionierung mittels Festphasenextraktion

Die gewonnenen Fraktionen, (siehe Abb. 9) unterschieden sich deutlich in ihrer Farbe.

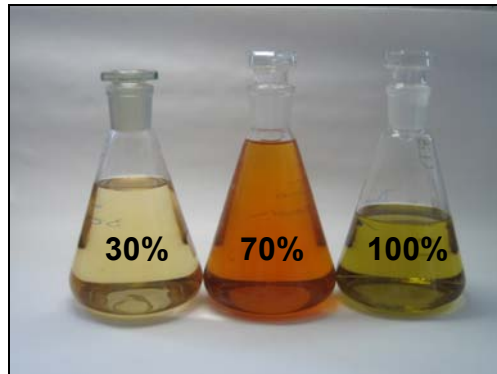


Abb. 9 30 %, 70 % und 100 % MeOH-Fractionen nach SPE

30 % MeOH-Fraktion: leicht gelb

70 % MeOH-Fraktion: orange

100 % MeOH-Fraktion: grün

Die einzelnen Fraktionen wurden am Rotationsverdampfer unter verminderten Druck bei 45 °C zur Trockene gebracht.

Ein Ziel dieser Diplomarbeit war es, die 100 % MeOH-Fraktion zu charakterisieren.

Die Ausbeute der 100 % MeOH-Fraktion betrug 1,94 g, welche für weitere Untersuchungen verwendet werden konnte.

4.4 Charakterisierung der 100 % Fraktion

Um einen Überblick über das Inhaltsstoffmuster der 100 % MeOH-Fraktion zu erhalten, wurde diese mit GC-MS und HPLC überprüft.

4.4.1 Überprüfung mittels GC-MS

Zur Analyse der flüchtigen Substanzen der 100 % MeOH-Fraktion wurde GC-MS verwendet. Es wurden 1,66 mg der 100 % MeOH-Fraktion eingewogen und in 1 ml Dichlormethan gelöst. Das Einspritzvolumen betrug 2 µl, alle weiteren Parameter sind in Tab. 7 zu finden. Das erhaltene Chromatogramm der 100 % MeOH-Fraktion ist in Abb. 10 zu sehen. Die Ergebnisse der Datenbanksuche sind in Abb. 11 bis Abb. 20 detailliert dargestellt und in Tab. 13 kurz zusammengefasst. Wie auch schon in vorangegangenen Diplomarbeiten [8, 16, 17] konnten viele langkettige Fettsäuren in dieser Fraktion nachgewiesen werden.

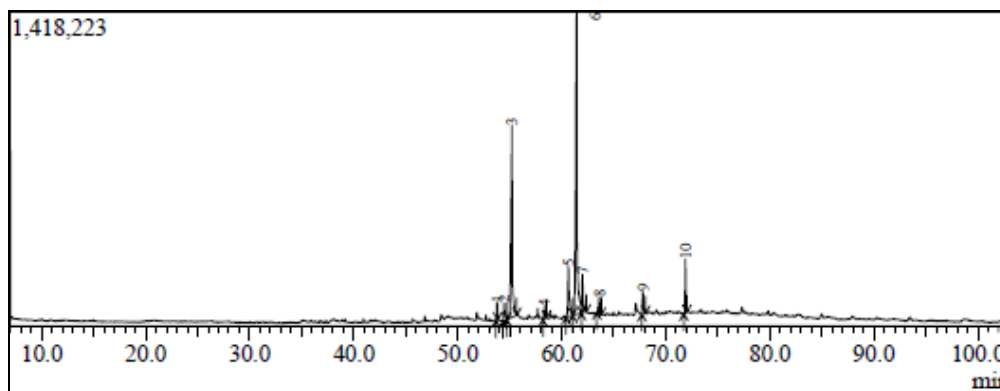


Abb. 10 TIC der 100 % MeOH-Fraktion

Peak #	Ret. Zeit	Name	Bibliothek
1	53,767	Hexadecanoic acid, methyl ester	NIST27
2	54,450	9-Hexadeenoic acid	WILEY229
3	55,200	n-Hexadecanoic acid	NIST27
4	58,283	Heptadecanoic acid	NIST27
5	60,633	Heptadecene-(8)-carbonic acid-(1)	WILEY229
6	61,433	Octadecanoic acid	WILEY229
7	61,983	Hexadecanamide	NIST27
8	63,583	Octadecanoic acid, trimethylsilyl ester	NIST27
9	67,783	Octadecanamide	NIST147
10	71,883	Di-n-octyl phthalate	NIST27

Tab. 13 Zusammenfassung der Ergebnisse der Datenbanksuche

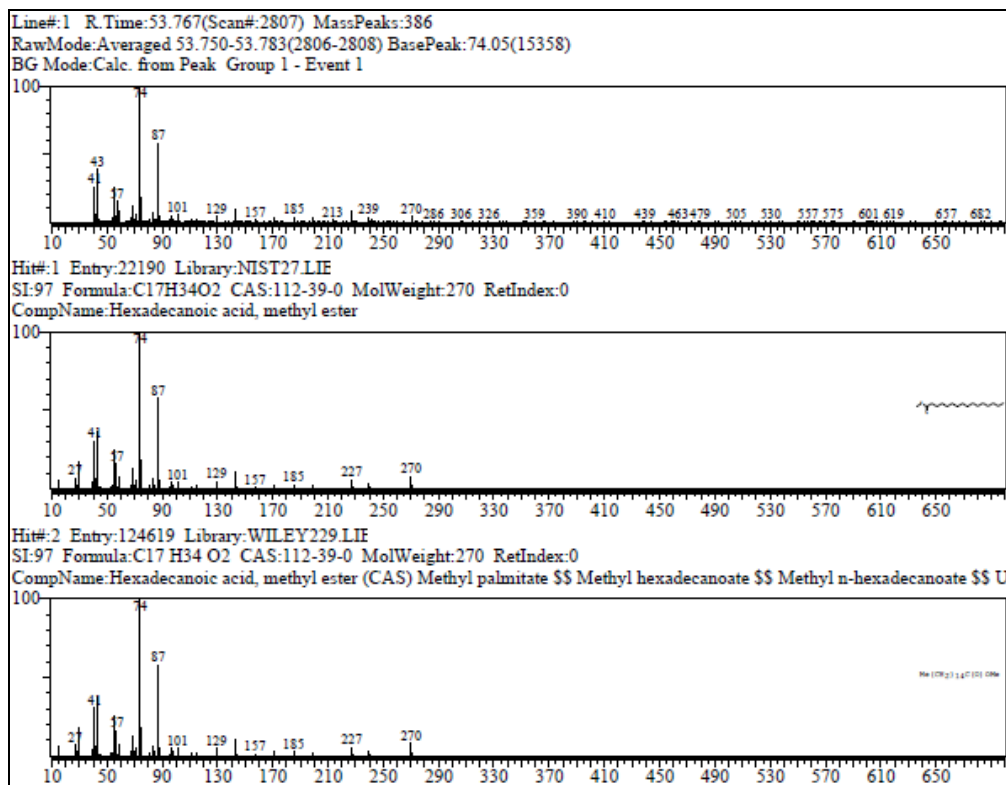


Abb. 11 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 1

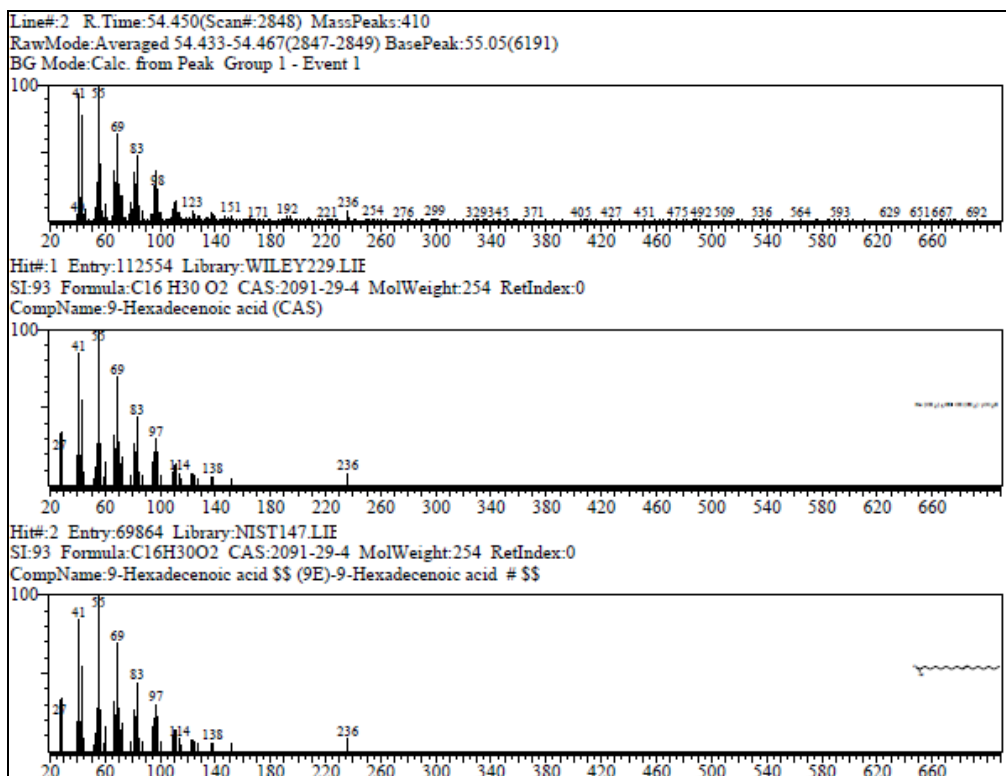


Abb. 12 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 2

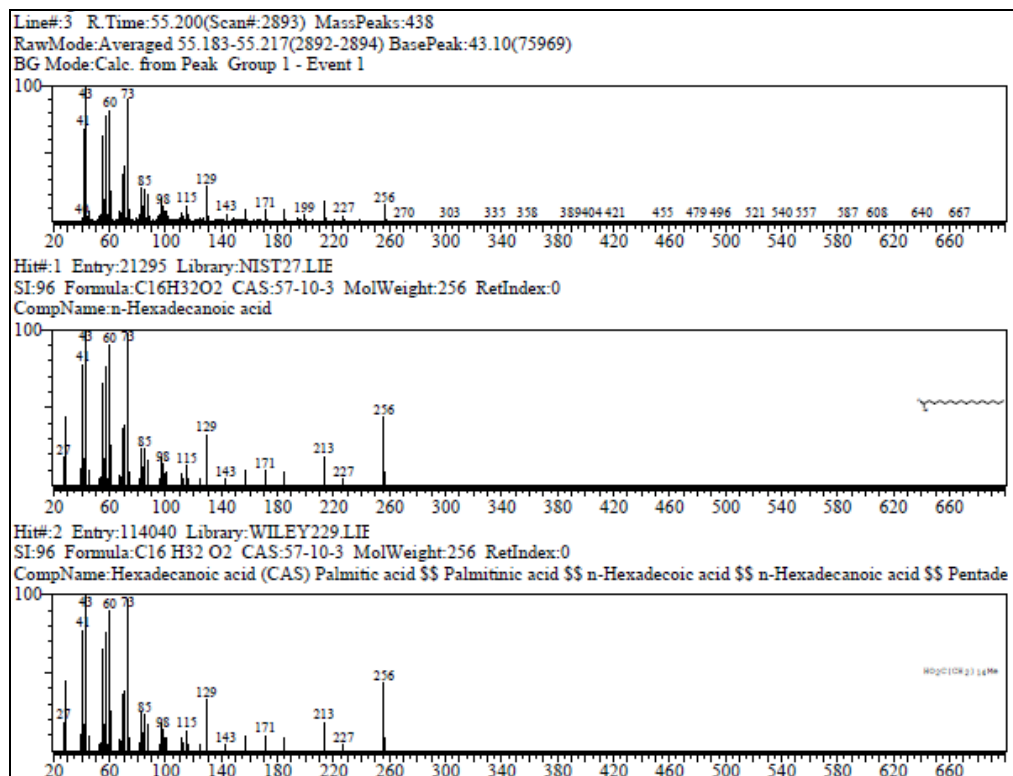


Abb. 13 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 3

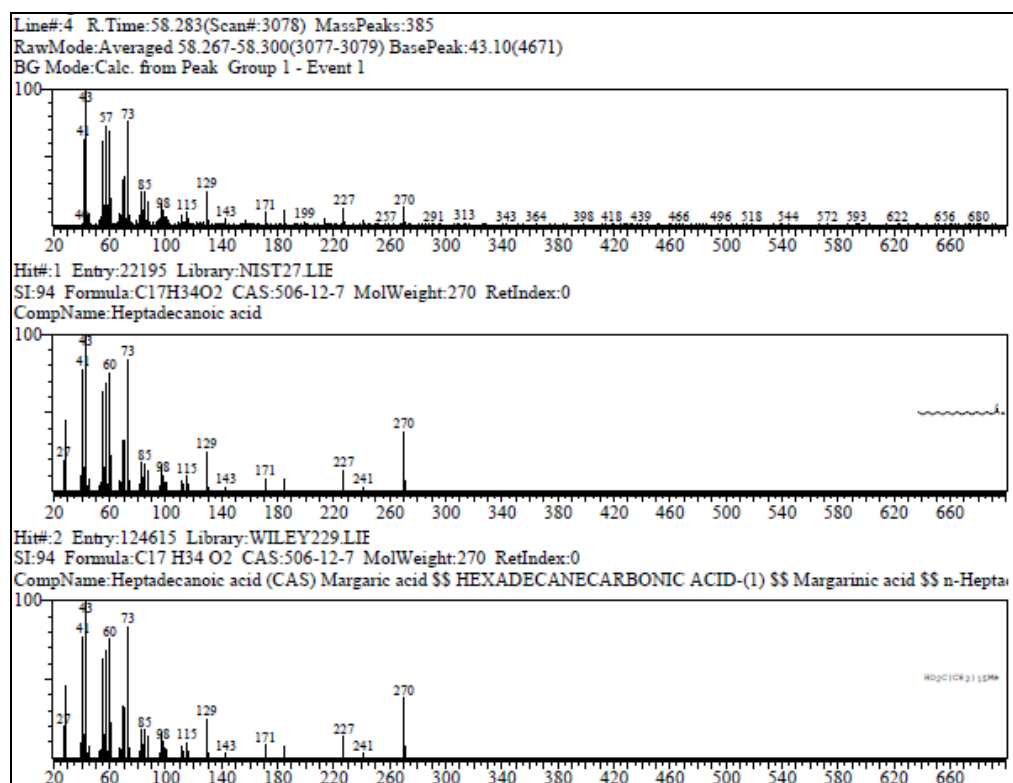


Abb. 14 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 4

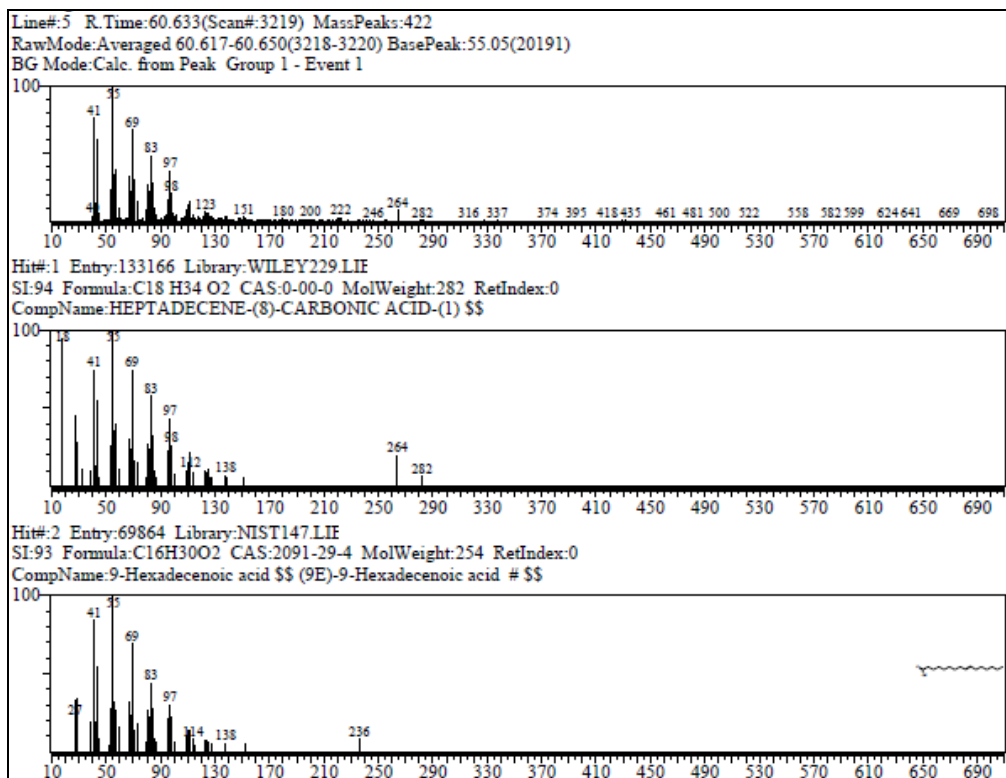


Abb. 15 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 5

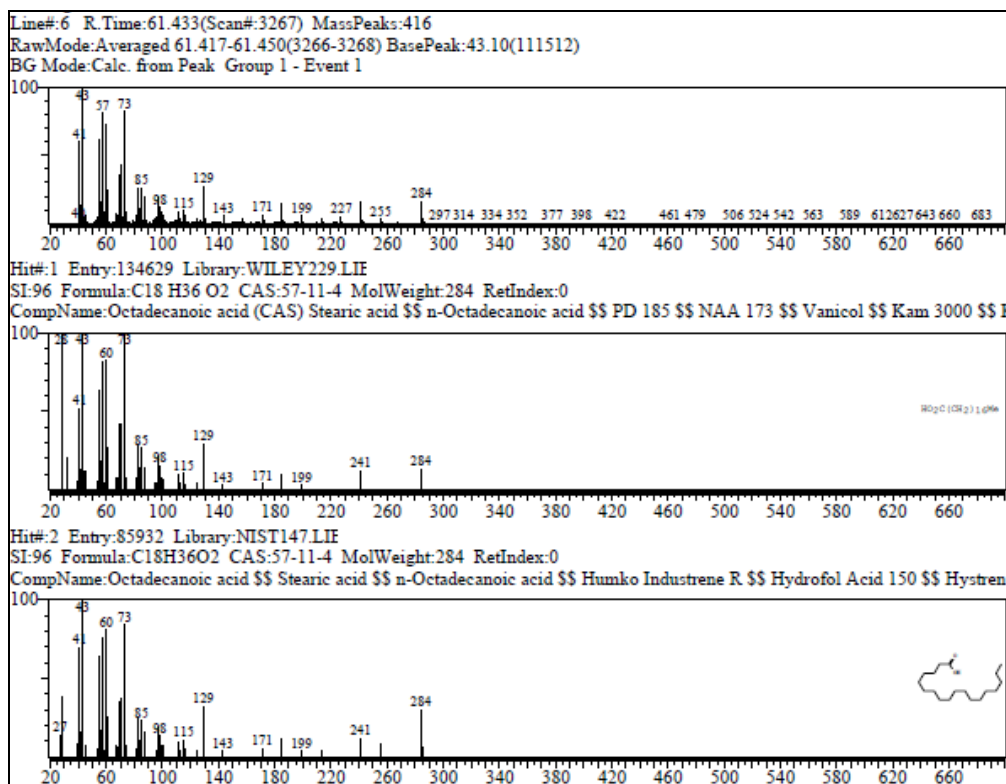


Abb. 16 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 6

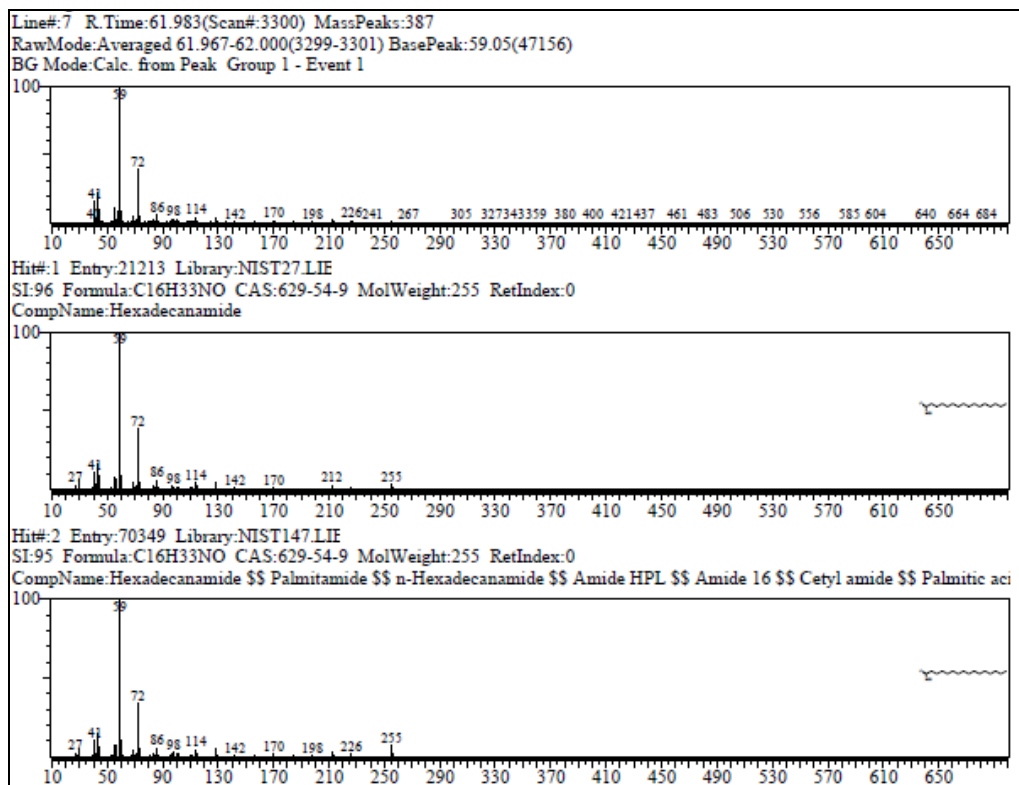


Abb. 17 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 7

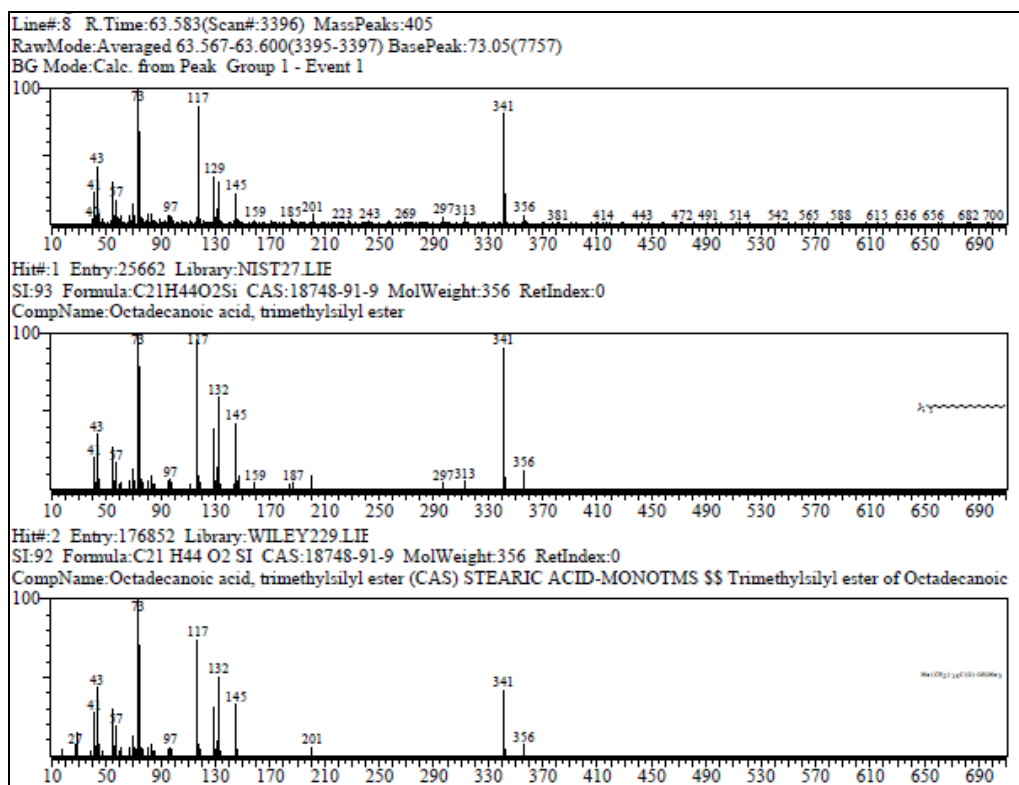


Abb. 18 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 8

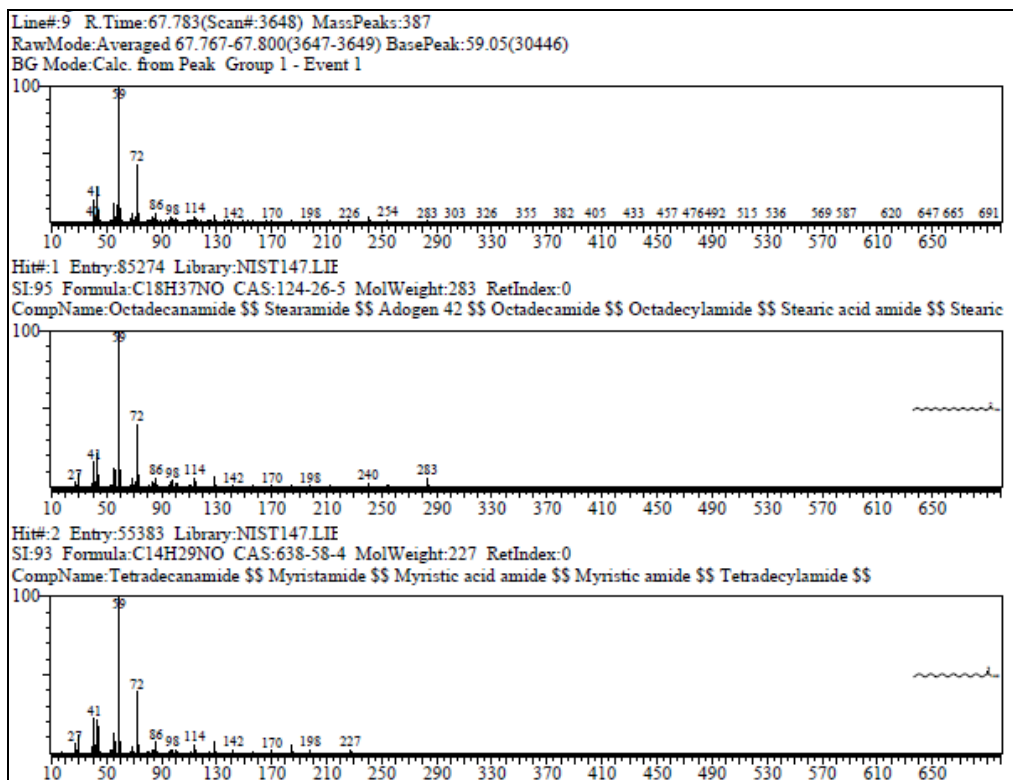


Abb. 19 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 9

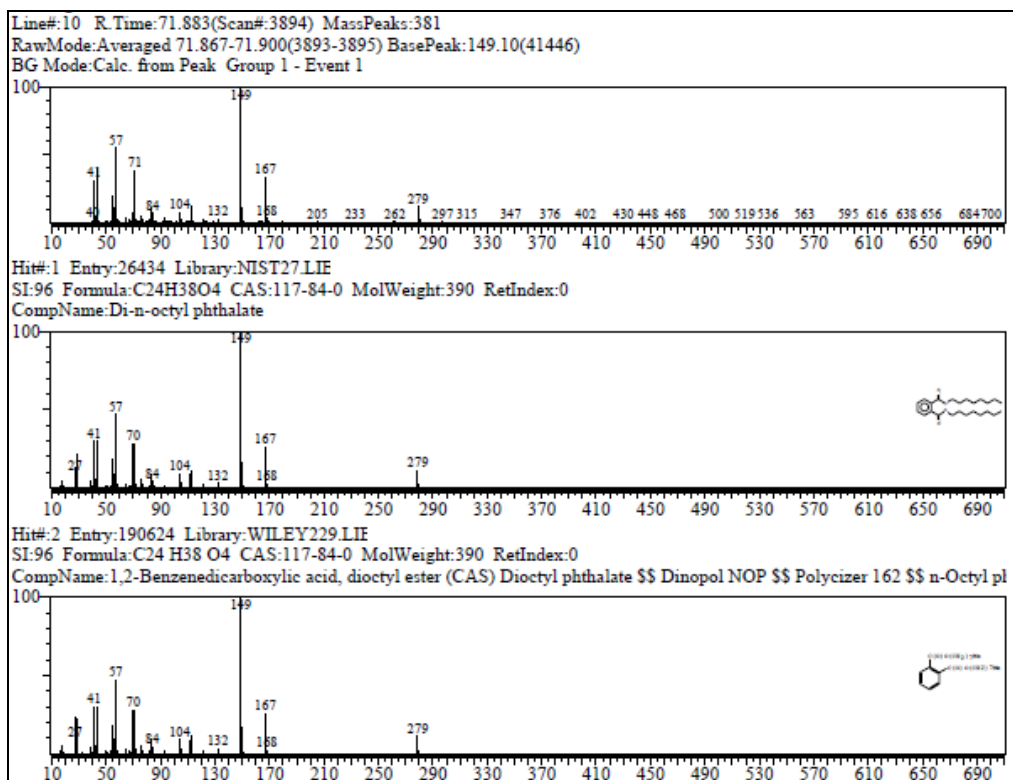


Abb. 20 Ergebnisse der Datenbanksuche für Peak Nr. 10

4.4.2 Überprüfung mittels HPLC

Es wurde hier die analytische HPLC gewählt, um erste Informationen über das Inhaltsstoffmuster der 100 % MeOH-Fraktion zu erhalten. Eine Mischung aus Methanol und Wasser, angesäuert mit Ameisensäure auf einen pH-Wert von 2,8 wurde als mobile Phase verwendet. Die weiteren Parameter sind in Tab. 8 und Tab. 9 genauer erläutert. Für die Detektion wurden folgende Wellenlängen verwendet:

⇒ 254 nm

⇒ 285 nm

⇒ 340 nm

Es zeigte sich in vorangegangenen Diplomarbeiten, dass diese Wellenlängen sich sehr gut für die Detektion von Substanzen aus Farnfraktionen eigneten. Die Chromatogramme der HPLC-Analyse bei verschiedenen Wellenlängen sind in Abb. 22 abgebildet. Von den zwei dominantesten Peaks wurden UV-Spektren aufgenommen, diese sind in Abb. 23 sichtbar. Weiters wurde eine Detektion mit dem ELSD (Lichtstreuendetektor) vorgenommen, ersichtlich in Abb. 21, damit konnten Substanzen detektiert werden, die im DAD nicht sichtbar sind.

Durch diese Informationen konnte eine Entscheidung getroffen werden, wie die weitere Subfraktionierung sinnvoll durchgeführt werden kann. Dies wird in Kapitel 4.5 näher behandelt.

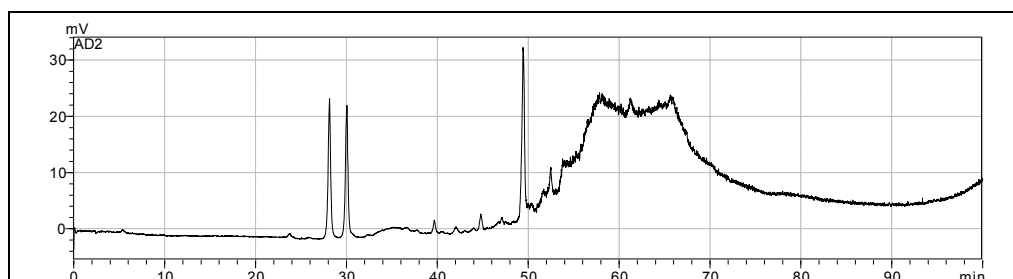


Abb. 21 ELSD-Signal der 100 % MeOH-Fraktion

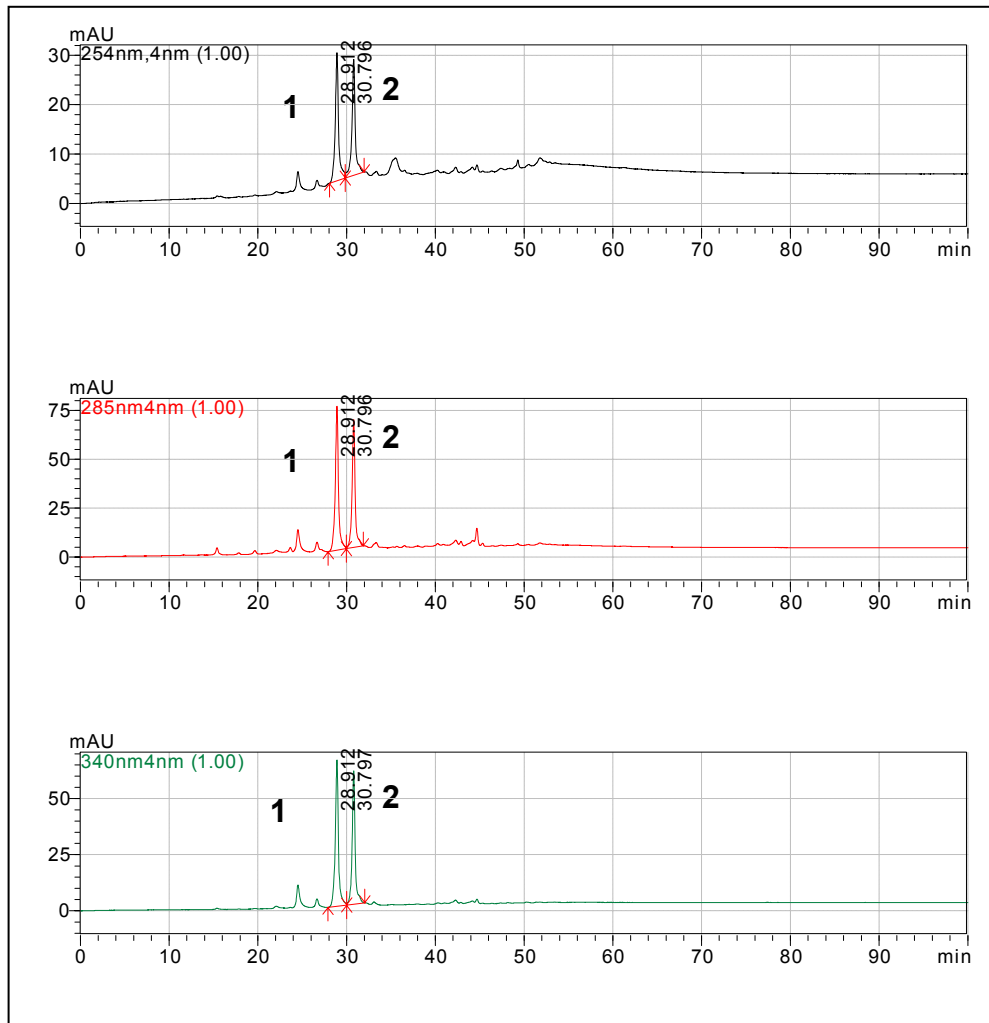


Abb. 22 HPLC Analyse der 100 % MeOH-Fraktion bei verschiedenen Wellenlängen

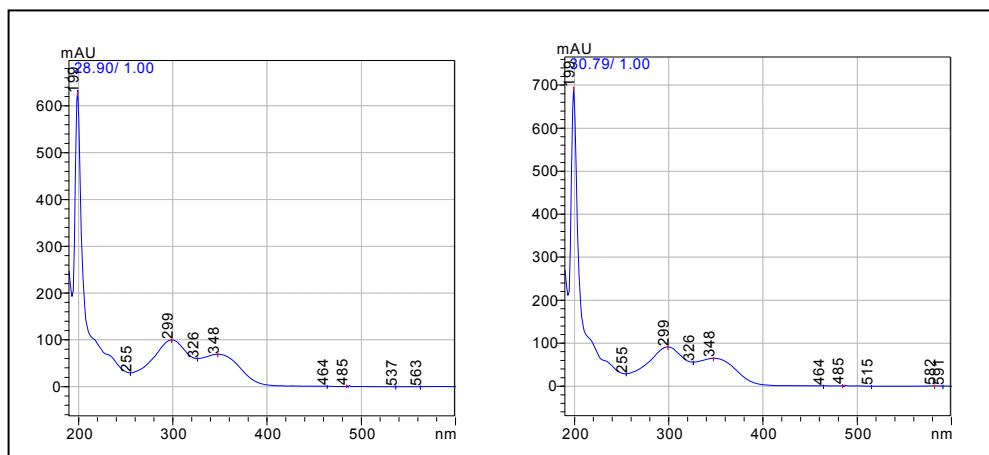


Abb. 23 UV-Spektren der Peaks 1 und 2 der 100 % MeOH-Fraktion bei 254 nm

4.4.3 Charakterisierung mittels LC-MS

Um weitere Informationen über das Inhaltsstoffmuster der 100 % MeOH-Fraktion zu bekommen, wurde eine Analyse mittels LC-MS durchgeführt. Zusätzlich wurden auch UV-Spektren mit einem Dioden-Array-Detektor aufgenommen.

Die Massenspektren wurden im negativen und positiven Modus durchgeführt. Die dominantesten Peaks des MS-1 wurden weiter fragmentiert, so erhielten wir das MS-2. Weiters wurde noch eine Fragmentierung der MS-2 Peaks durchgeführt, um zum MS-3 zu gelangen. Es zeigte sich, dass im MS-3 keine wichtigen Informationen zu sehen waren, daher wurde nur das MS-1 und MS-2 für die Charakterisierung der Substanzen herangezogen.

Bei der Strukturanalyse stützte man sich auf die Publikationen von Widén „Fast-Atom-Bombardment Mass Spectra of Phloroglucinols from *Dryopteris* Ferns“ [12] und „Die Phloroglucide von *Dryopteris villarii* (Bell.) Woynar und anderer Farne der Gattung *Dryopteris* sowie die mögliche Abstammung von *D. filix-mas* (L.) Schott“ [13].

In Abb. 24 sind die „Basispeak Chromatogramme“ (BPC) der 100 % MeOH-Fraktion einmal im positiven Modus und einmal im negativen Modus und ein UV-Chromatogramm der 100 % MeOH-Fraktion, gebildet aus der Summe aller Wellenlängen von 190-800 nm, zu sehen. Abb. 25 zeigt die dreidimensionale Darstellung der HPLC-Analyse der 100 % MeOH-Fraktion mit Dioden-Array-Detektor. Auf der x-Achse ist die Zeit in Minuten, auf der y-Achse die Wellenlänge in nm angegeben und auf der z-Achse ist durch einen Farbcode die Höhe der Absorption ersichtlich, je heller desto höher die Absorption.

In Abb. 26 bis Abb. 47 sind die einzelnen Massen Spektren der dominantesten Peaks ersichtlich und in weiterer Folge sind die Strukturvorschläge und deren Fragmentierungsmöglichkeiten abgebildet.

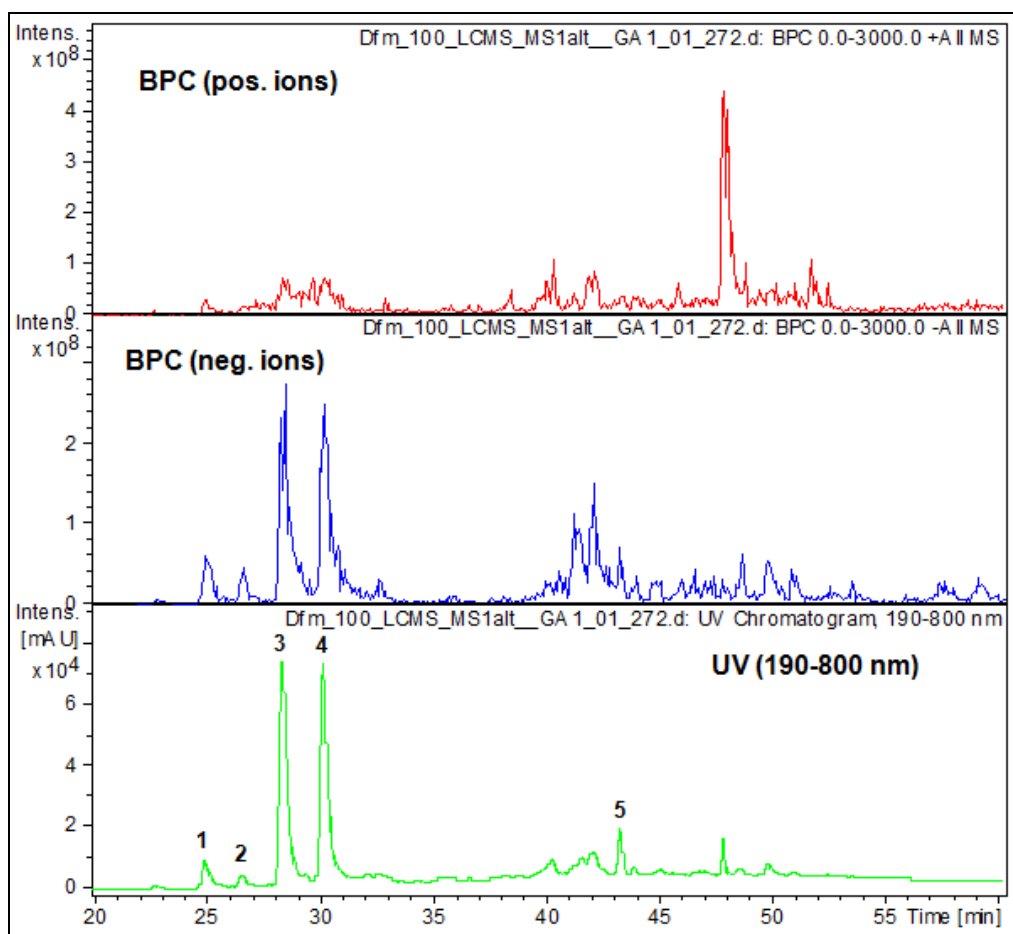


Abb. 24 Basispeak Chromatogramm der 100 % MeOH-Fraktion im positiv Modus und negativ Modus; UV-Chromatogramm bei 190-800 nm

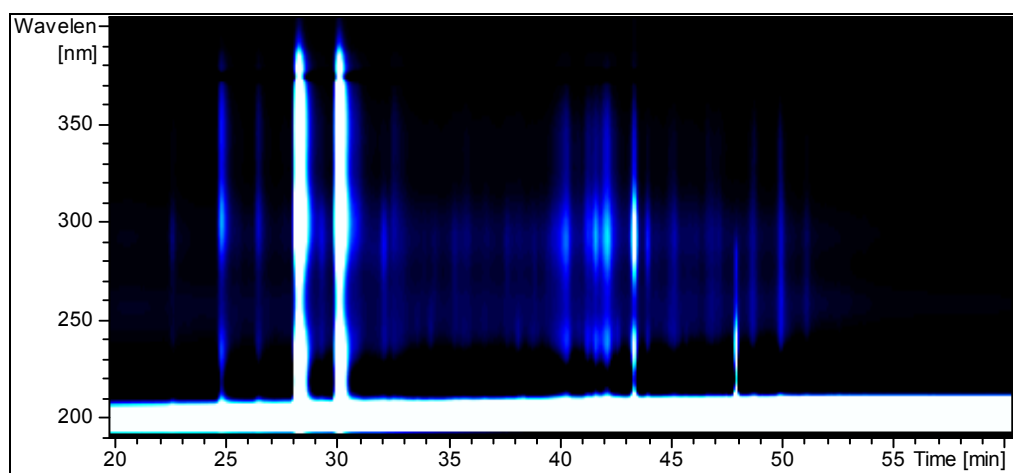


Abb. 25 HPLC-Analyse der 100 % MeOH-Fraktion mit DAD

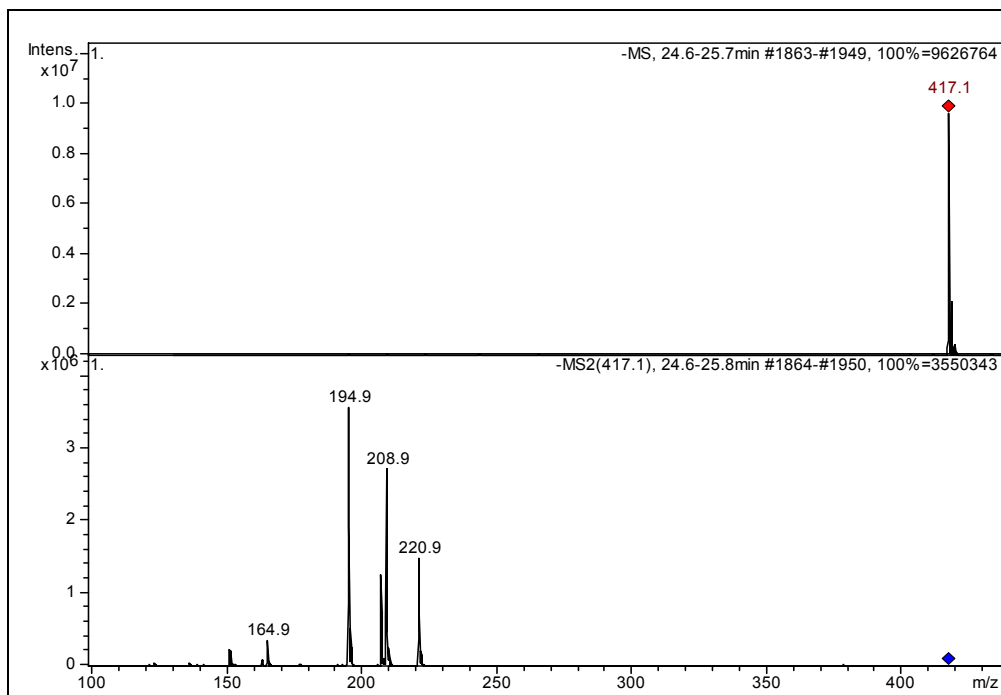


Abb. 26 Negative ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR1

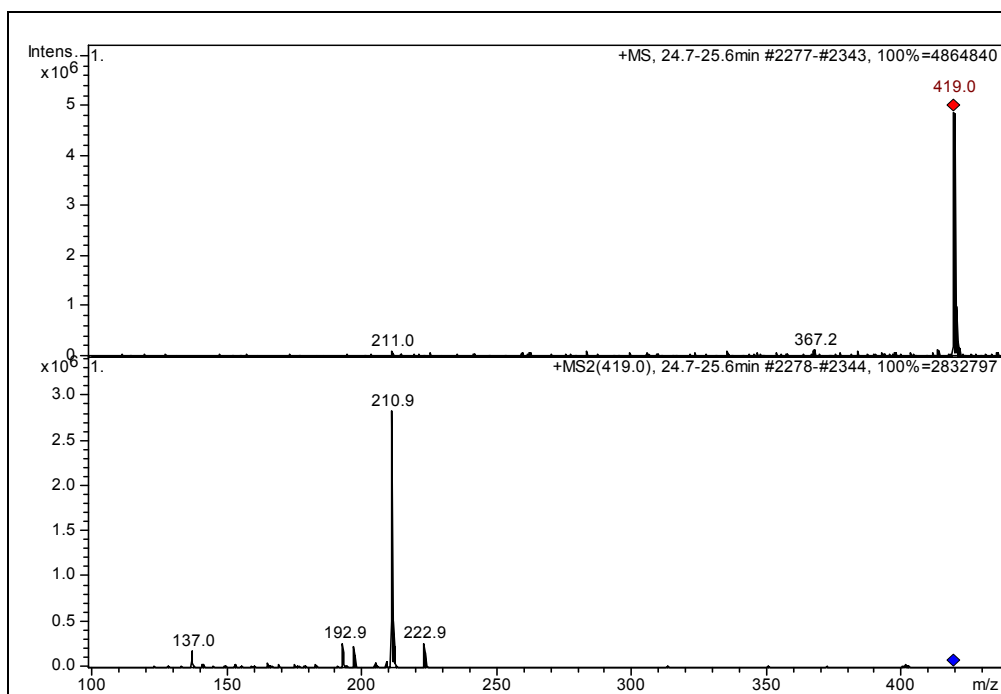


Abb. 27 Positive ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR1

CNR1:

24,6-25,7min

MS-1 im negativen Modus $[M-H]^-$: m/z 417,1 (siehe Abb. 26)

MS-1 im positiven Modus $[M+H]^+$: m/z 419,0 (siehe Abb. 27)

Molekulargewicht = 418

Zu diesem Molekulargewicht findet man in der Literatur folgende Strukturvorschläge, abgebildet in Abb. 28 und Abb. 29.

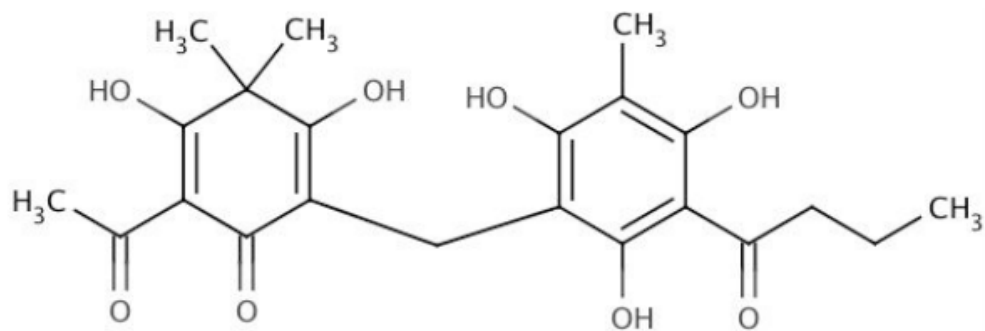
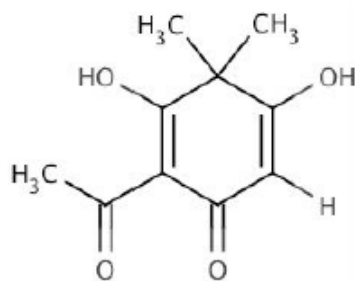
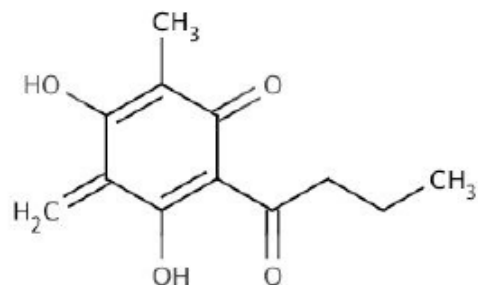


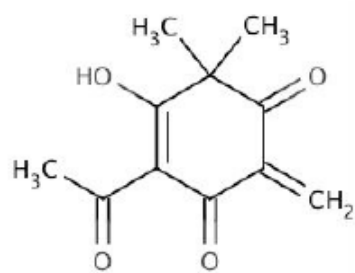
Abb. 28 Flavaspidsäure AB (MW = 418,1)



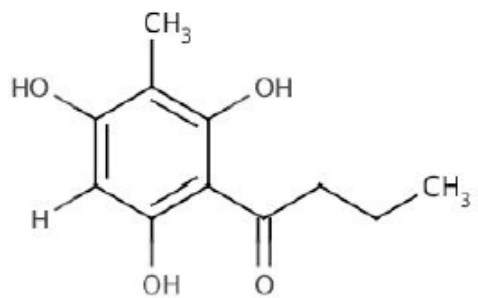
MG = 196



MG = 222



MG = 208



MG = 210

Abb. 29 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure AB

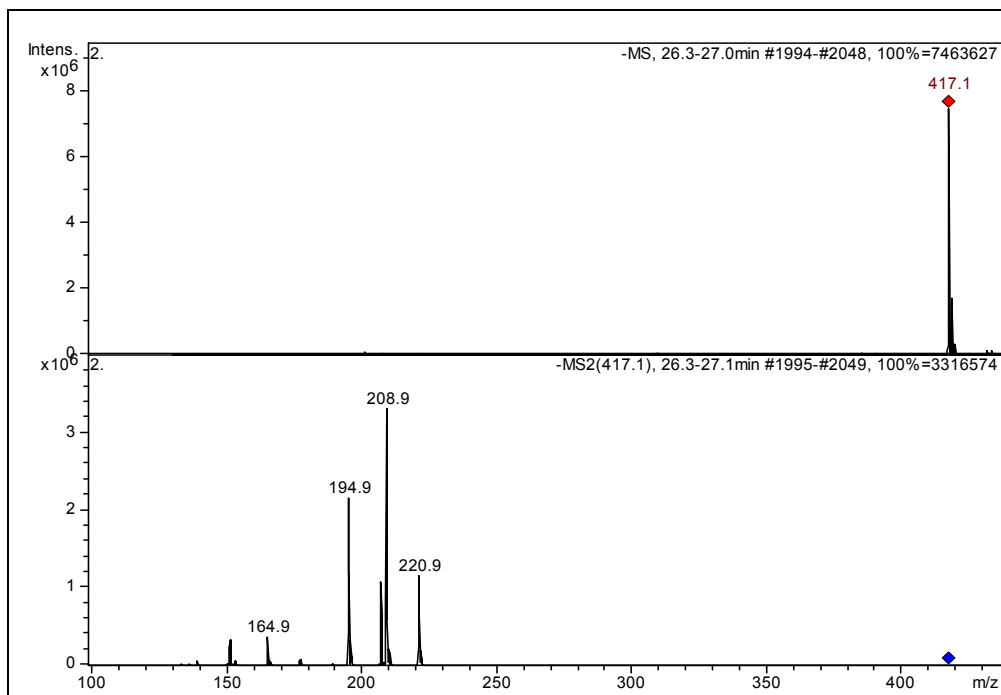


Abb. 30 Negative ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR2

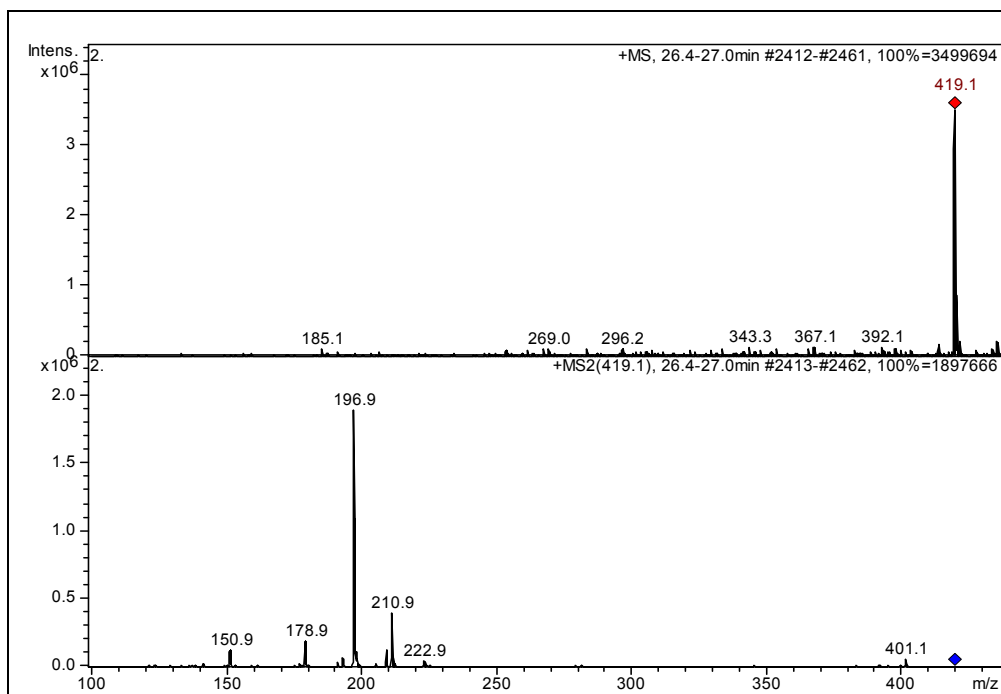


Abb. 31 Positive ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR2

CNR2:

26,3-27,0min

MS-1 im negativen Modus $[M-H]^-$: m/z 417,1 (siehe Abb. 30)

MS-1 im positiven Modus $[M+H]^+$: m/z 419,1 (siehe Abb. 31)

Molekulargewicht = 418,1

Zu diesem Molekulargewicht findet man in der Literatur folgende Strukturvorschläge, abgebildet in Abb. 32 und Abb. 33.

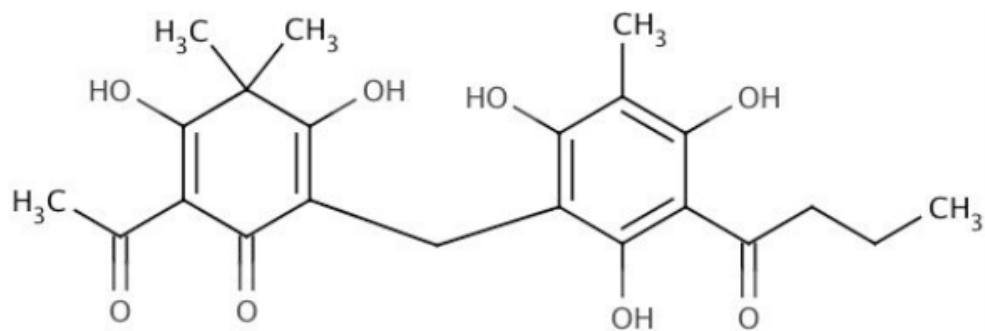
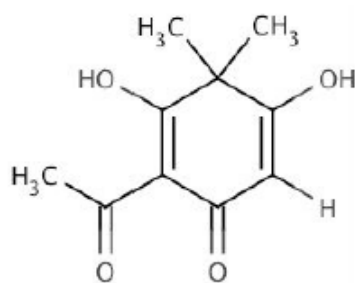
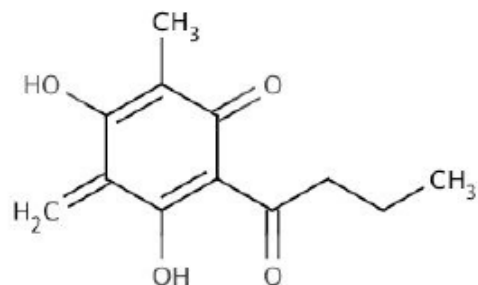


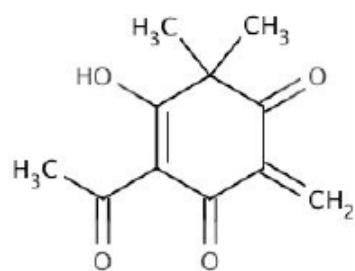
Abb. 32 Flavaspidsäure AB (MW = 418,1)



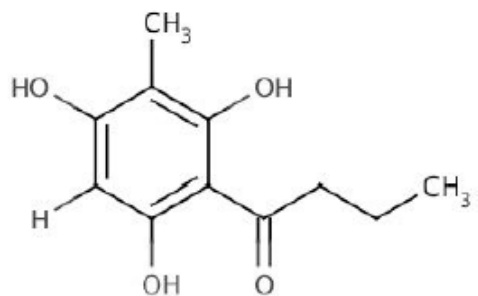
MG = 196



MG = 222



MG = 208



MG = 210

Abb. 33 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure AB

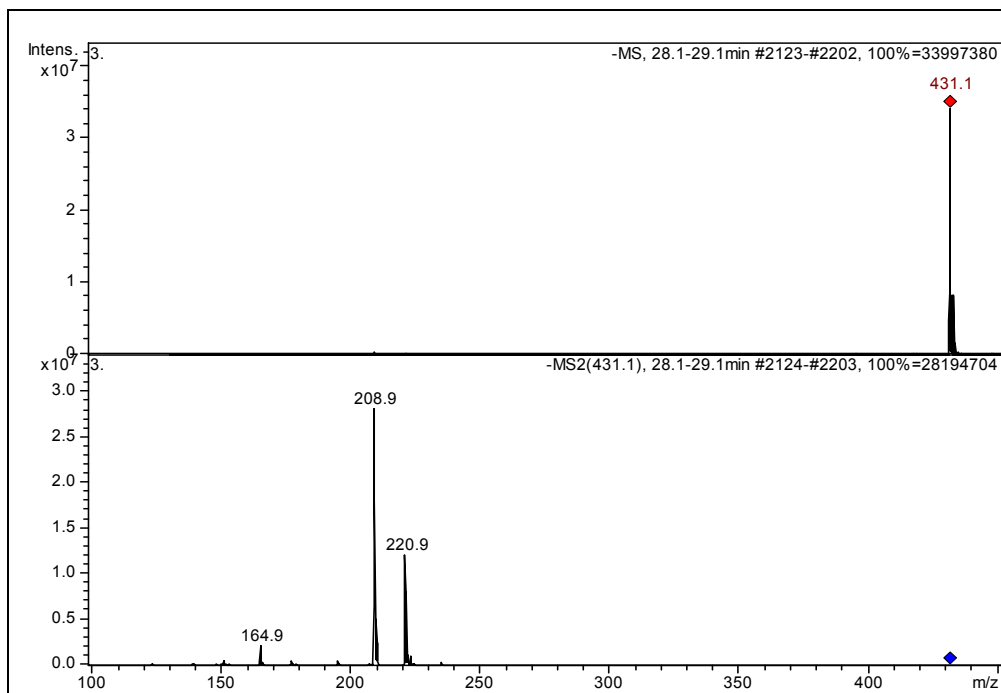


Abb. 34 Negative ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR3

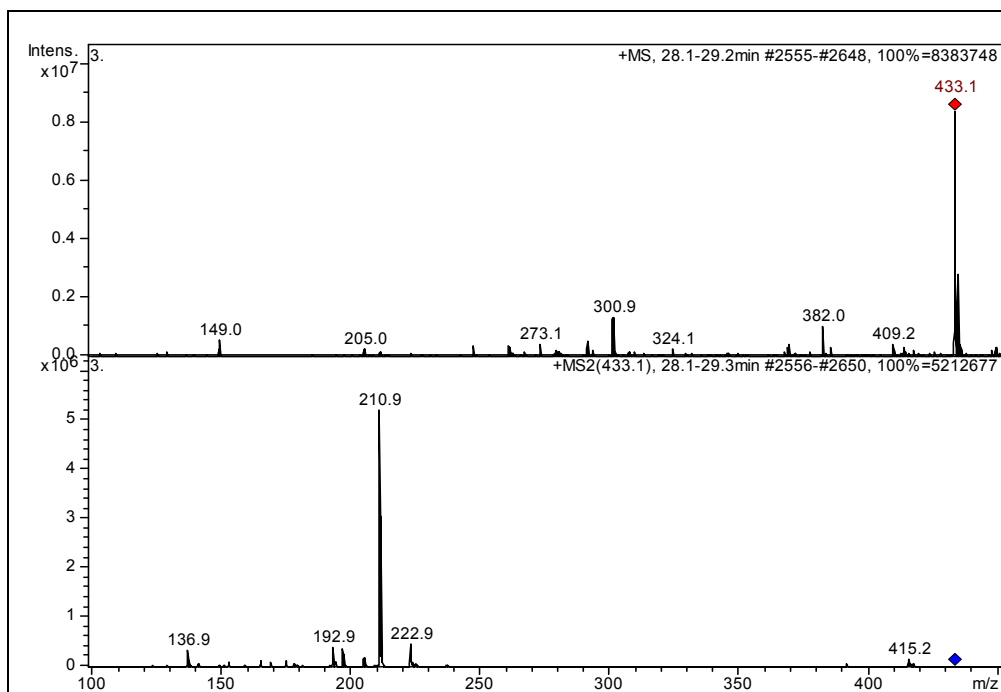


Abb. 35 Positive ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR3

CNR3:

28,1-29,1min

MS-1 im negativen Modus $[M-H]^-$: m/z 431,1 (siehe Abb. 34)

MS-1 im positiven Modus $[M+H]^+$: m/z 433,1 (siehe Abb. 35)

Molekulargewicht = 432,1

Zu diesem Molekulargewicht findet man in der Literatur folgende Strukturvorschläge, abgebildet in Abb. 36 und Abb. 37.

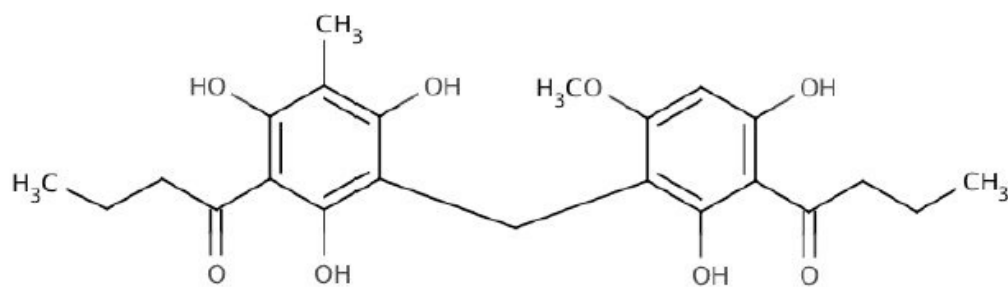
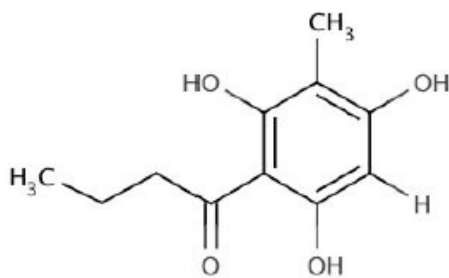
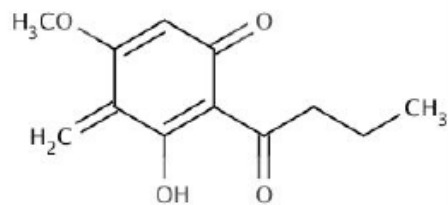


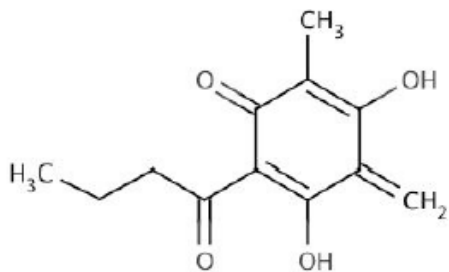
Abb. 36 Phloraspin BB (MW = 432,5)



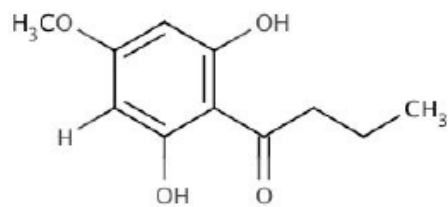
MG = 210



MG = 222



MG = 222



MG = 210

Abb. 37 Fragmentierungsmöglichkeiten von Phloraspin BB

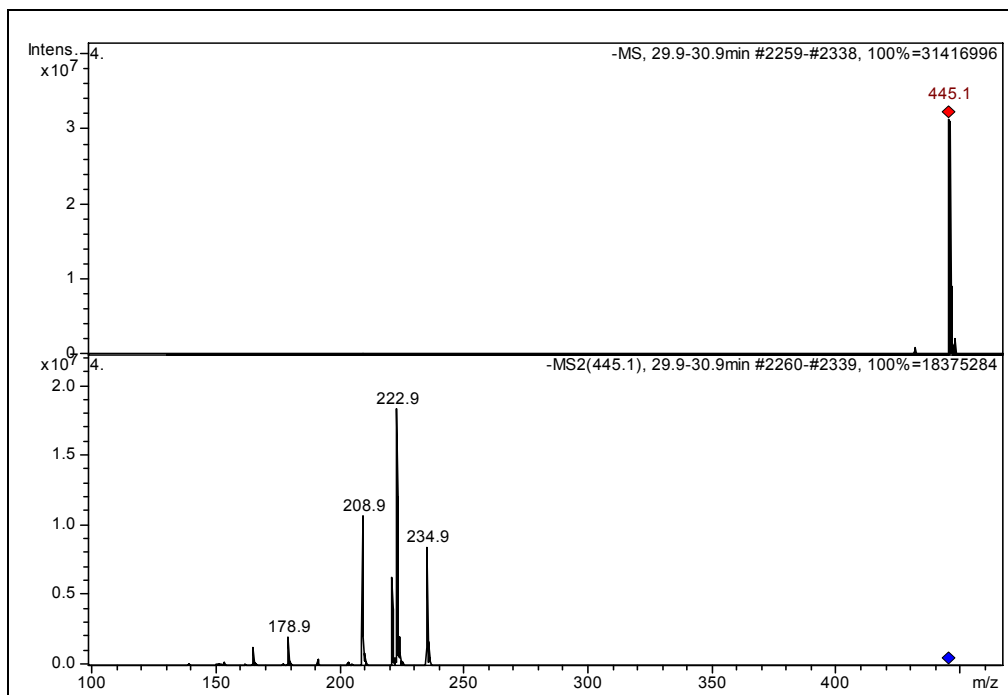


Abb. 38 Negative ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR4

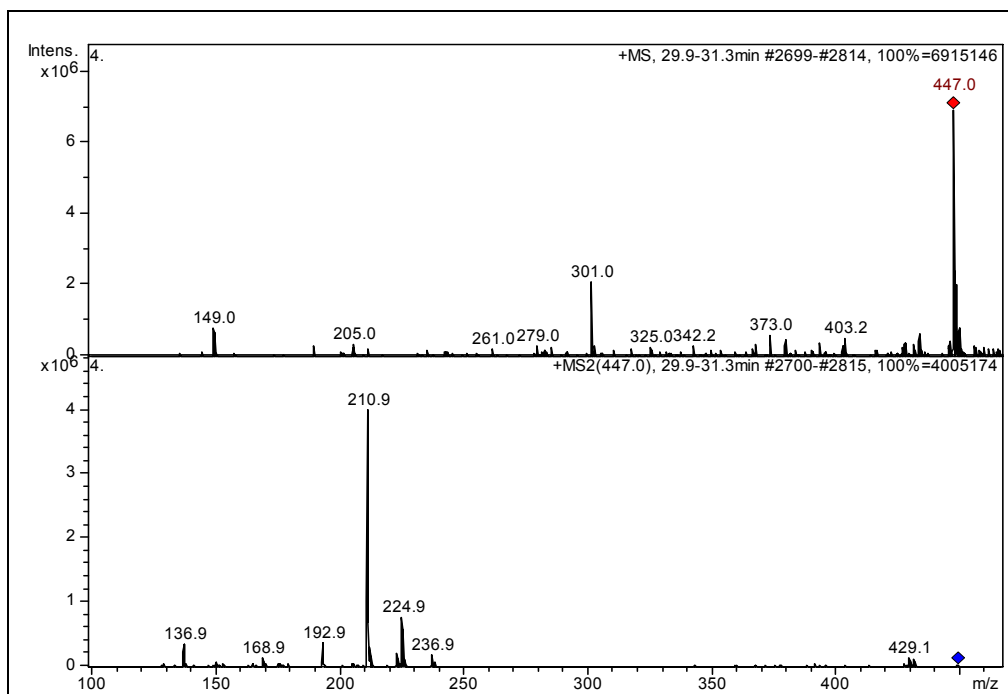


Abb. 39 Positive ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR4

CNR4:

29,9-30,9min

MS-1 im negativen Modus $[M-H]^-$: m/z 445,1 (siehe Abb. 38)

MS-1 im positiven Modus $[M+H]^+$: m/z 447,0 (siehe Abb. 39)

Molekulargewicht = 446,0

Zu diesem Molekulargewicht findet man in der Literatur folgende Strukturvorschläge, abgebildet in Abb. 40, Abb. 41, Abb. 42 und Abb. 43.

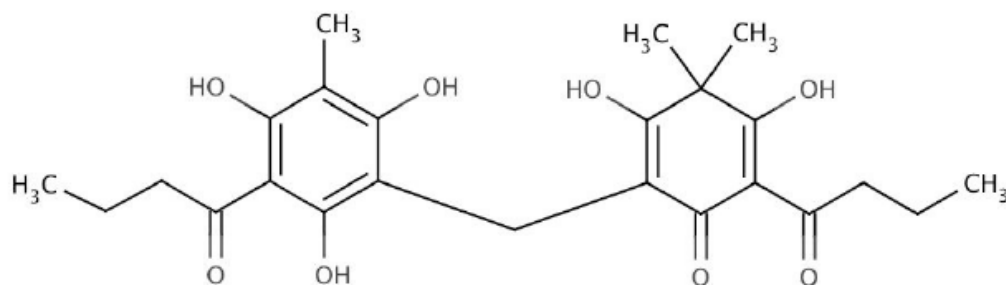
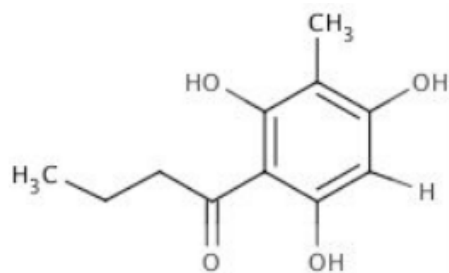
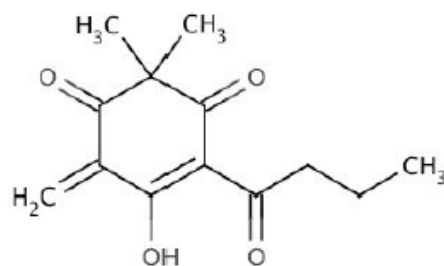


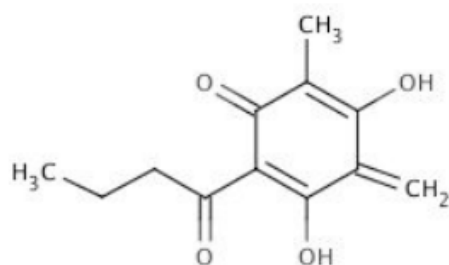
Abb. 40 Flavaspidsäure BB (MW = 446,5)



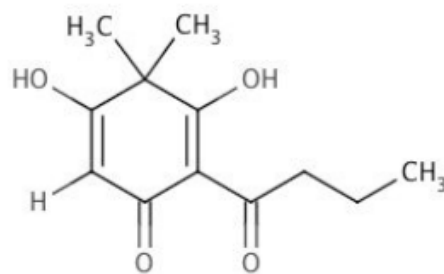
MG = 210



MG = 236



MG = 222



MG = 224

Abb. 41 Fragmentierungsmöglichkeiten der Flavaspidsäure BB

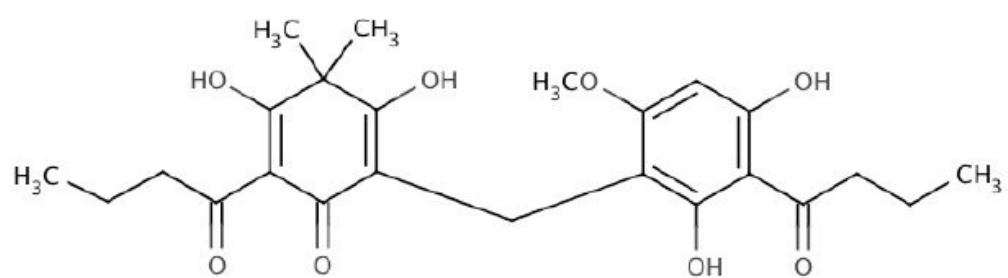


Abb. 42 Desaspidin (MW = 446,5)

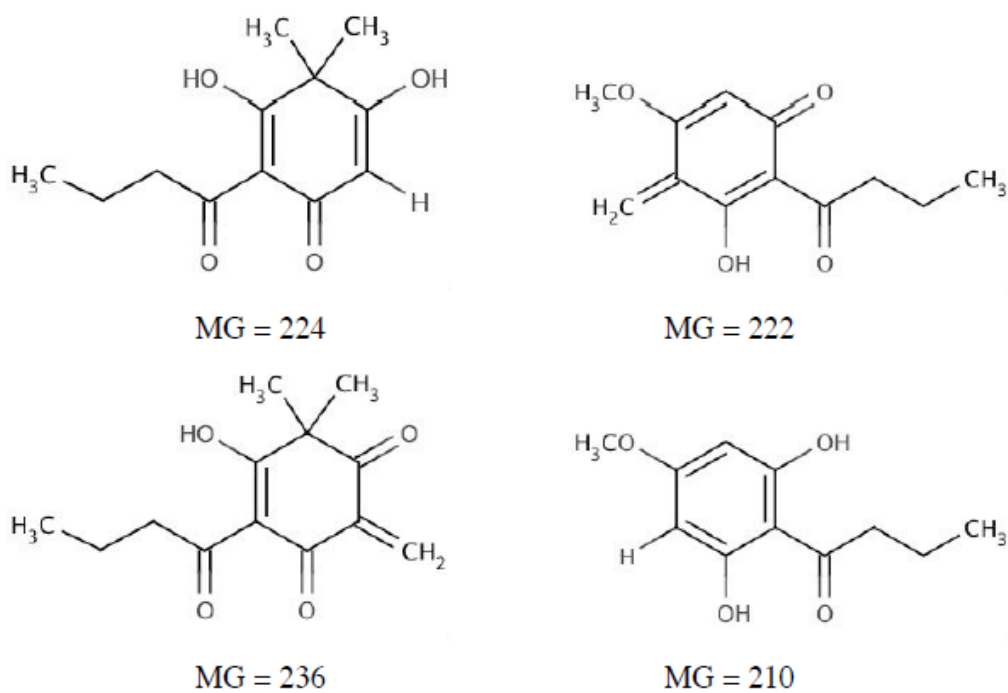


Abb. 43 Fragmentierungsmöglichkeiten des Desaspidin

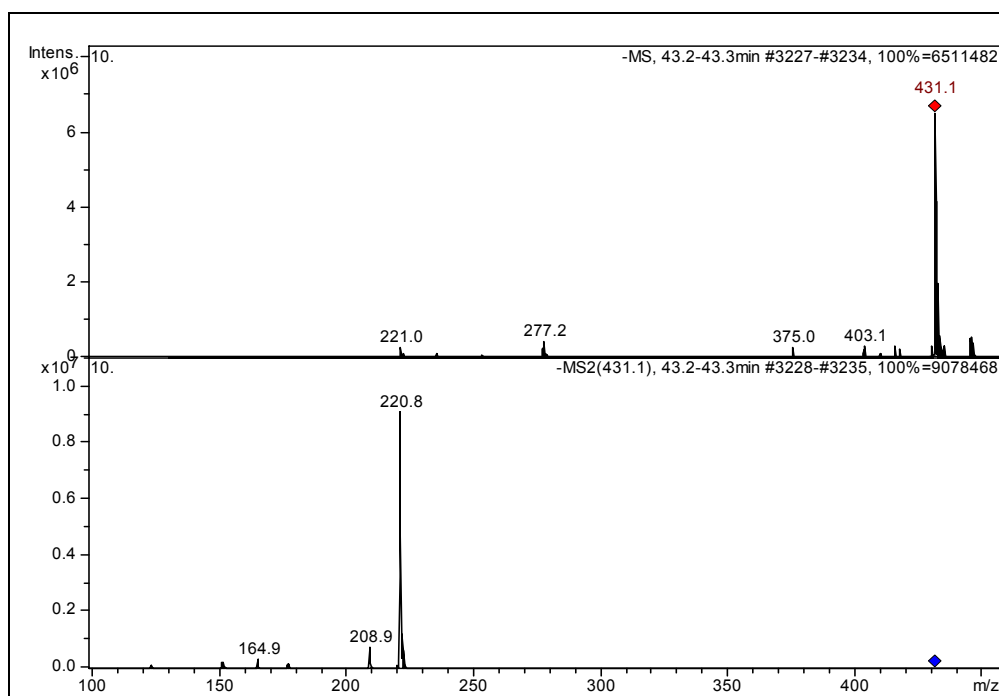


Abb. 44 Negative ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR5

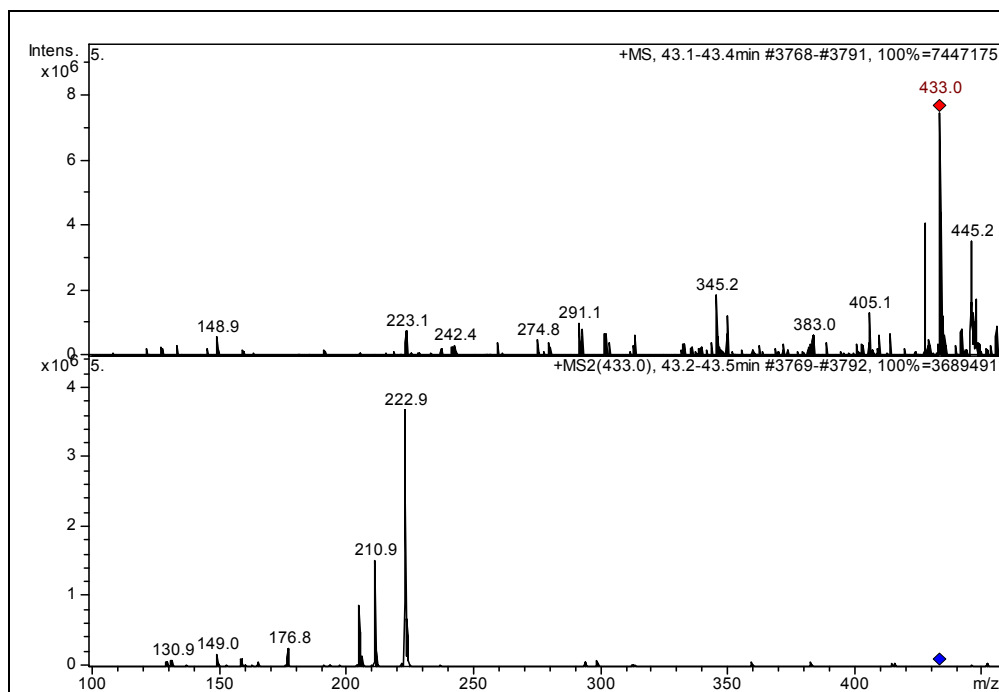


Abb. 45 Positive ion mode ESI-IT-MSⁿ (n=1-2) spectra of CNR5

CNR5:

43,2-43,3min

MS-1 im negativen Modus $[M-H]^-$: m/z 431,1 (siehe Abb. 44)

MS-1 im positiven Modus $[M+H]^+$: m/z 433,0 (siehe Abb. 45)

Molekulargewicht = 432,0

Zu diesem Molekulargewicht findet man in der Literatur, folgende Strukturvorschläge, abgebildet in Abb. 46 und Abb. 47.

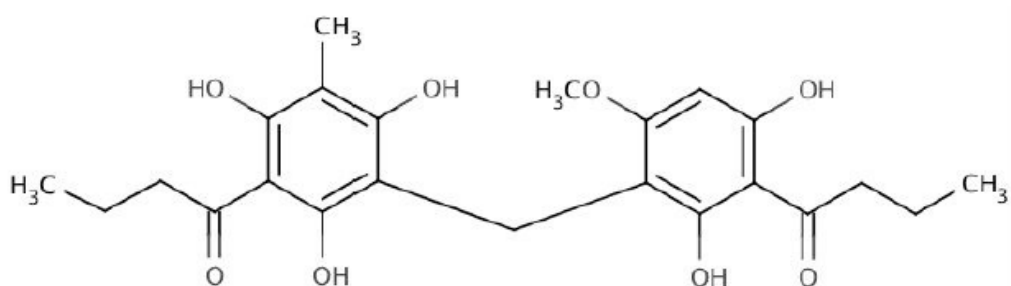


Abb. 46 Phloraspin BB (MW = 432,5)

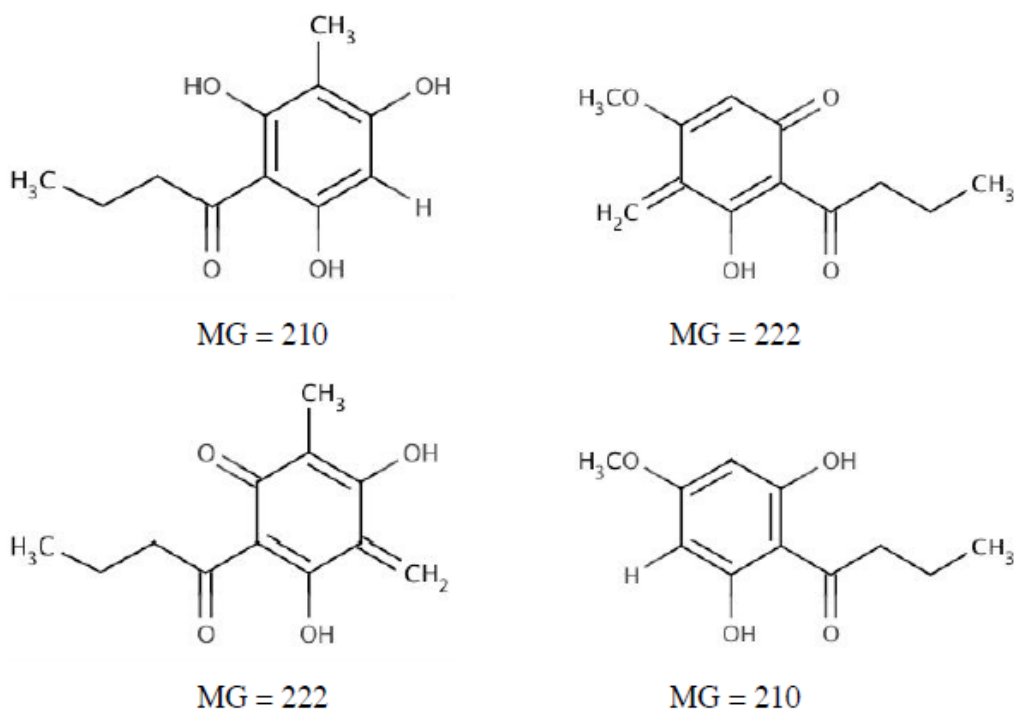


Abb. 47 Fragmentierungsmöglichkeiten von Phloraspin BB

4.4.4 DC Überprüfung der Phloroglucinole

Die bereits durchgeführten Analysen gaben Hinweise darauf, dass sich in der 100 % MeOH-Fraktion sehr viele für Farne bekannte Phloroglucinol-Derivate befinden. Um dies zu überprüfen, wurde in der Literatur nach einer geeigneten Dünnschichtchromatographie Methode gesucht, die zur Auffindung von Phloroglucinolen dient.

Dabei wurde eine Methode für *Filicis rhizoma* [11] herangezogen:

50 mg Probe (70 % MeOH-Fraktion und 100 % MeOH-Fraktion) wurden in 0,5 ml Dichlormethan gelöst und davon wurden 2 µl auf die DC aufgetragen. Die Referenzsubstanzen waren Resorcin (T7) und Phloroglucin (T8), von beiden wurde 1 mg Substanz in 1 ml Methanol gelöst und jeweils 2 µl auf die DC aufgetragen. Als Fließmittel wurde eine Mischung aus Chloroform und Methanol (85+15) verwendet. Als Sprühreagenz wurde bei der 1. DC (siehe Abb. 48) Echtrotsalz und bei der 2. DC (siehe Abb. 49) Echtblausalz verwendet, weil sie gut mit phenolischen Verbindungen reagieren.

Bei Tageslicht sind auf beiden Dünnschichtchromatogrammen rotbraune Banden zu sehen. Laut Literatur deuten diese Banden auf das Vorliegen von Phloroglucinolen hin. Weiters ist gut ersichtlich, dass in der 100 % MeOH-Fraktion mengenmäßig deutlich mehr Phloroglucinole vorhanden sind als in der 70 % MeOH-Fraktion.

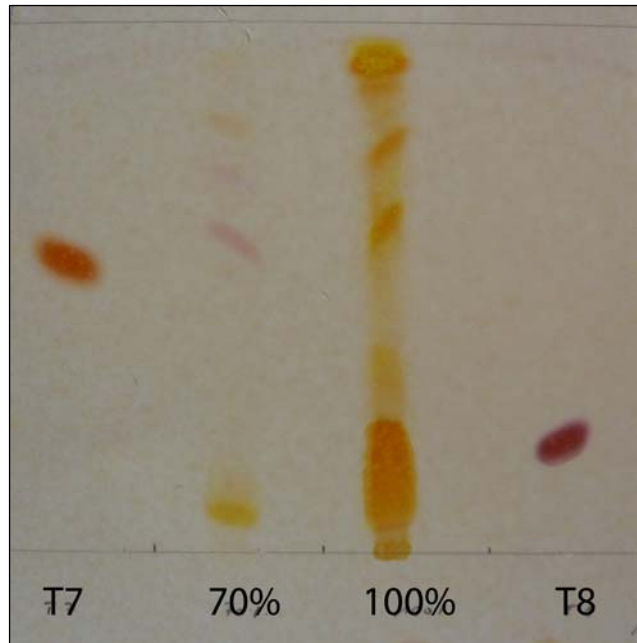


Abb. 48 DC-Überprüfung der Phloroglucinole mit Echtrotsalz bei Tageslicht

T7 = Resorcin

T8 = Phloroglucin

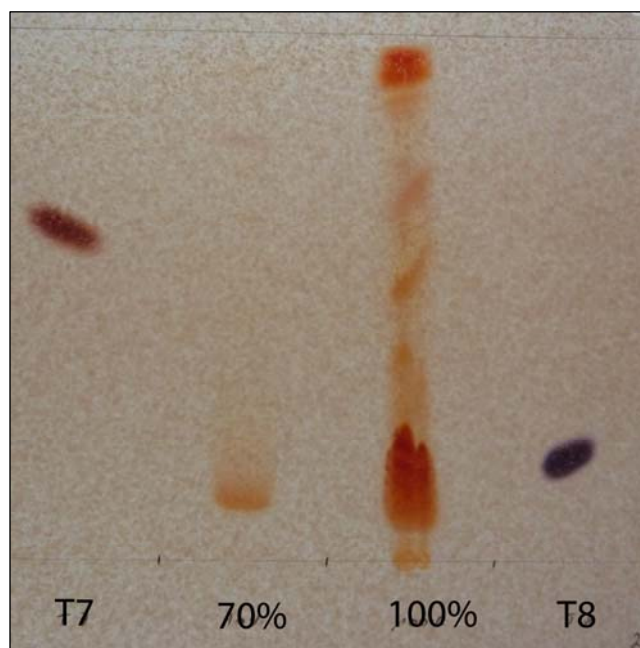


Abb. 49 DC-Überprüfung der Phloroglucinole mit Echtblausalz bei Tageslicht

4.5 Subfraktionierung der 100 % MeOH-Fraktion mittels semipräparativer HPLC

Die Überprüfung der 100 % MeOH-Fraktion mittels analytischer HPLC diente als Grundlage für die Auswahl der Subfraktionen. In erster Linie wurde das Hauptaugenmerk auf die 2 dominantesten Peaks gelegt. Die Retentionszeit der beiden Peaks betrug bei Peak Nummer 1 28,9 min und bei Peak Nummer 2 30,8 min.

Daher wurde festgelegt, dass Subfraktion 1 von Minute 0-28 in einem Kolben gesammelt wird. Dann wurde von Minute 28-29,5 Subfraktion 2 gesammelt. Um eine bessere Trennung zwischen den beiden Peaks zu erreichen, entschied man sich für eine Zwischensammlung von Minute 29,5-30, dies war die Subfraktion 2-3. Weiters wurde die Subfraktion 3 von Minute 30-31 gesammelt. Dann kam Subfraktion 4 von Minute 31-49. In Abb. 50 ist eine Übersicht der Einteilung der Subfraktionen 1-4 dargestellt.

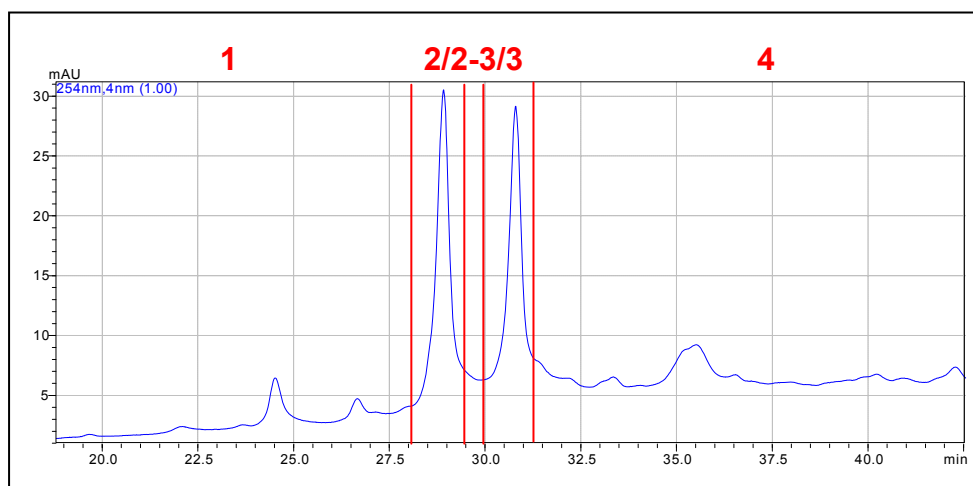


Abb. 50 Einteilung der Subfraktionen 1, 2, 2-3, 3 und 4

Dann orientierte man sich an dem Chromatogramm des Lichtstreuendetektors, wo ein Peak ca. bei Minute 50 zu sehen war. Die Subfraktion 5 wurde also von Minute 49-51 gesammelt. Dann wurde noch die Subfraktion 6 von Minute 51 bis Ende des Laufs gesammelt. In Abb. 51 ist eine Übersicht der Einteilung der Subfraktionen 5-6 dargestellt.

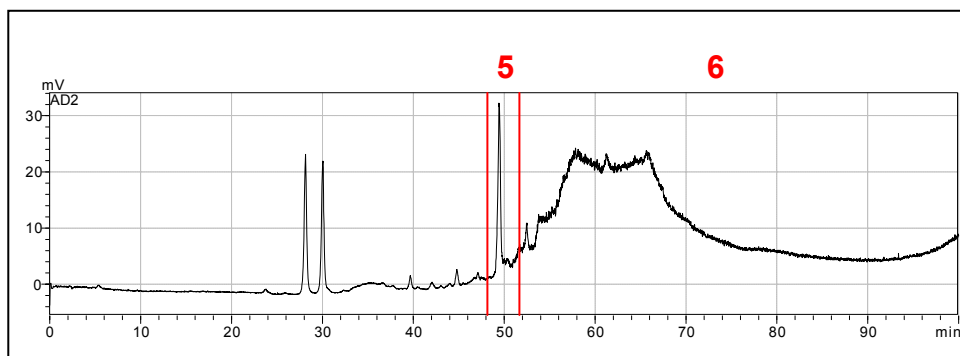


Abb. 51 Einteilung der Subfraktionen 5 und 6

Es wurden insgesamt 30 Läufe mit jeweils 40 µl Einspritzvolumen durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck bei 45 °C zur Trockene gebracht. Die eingeeengten Subfraktionen wurden dann in Eppendorf Gefäße übergeführt und für die HPLC Analyse jeweils in 1 ml MeOH gelöst.

Dann wurde eine Überprüfung der Reinheit der Subfraktionen 1-6 mittels HPLC durchgeführt, die Chromatogramme bei verschiedenen UV-Wellenlängen sind in Abb. 52, Abb. 54, Abb. 56, Abb. 58, Abb. 60, Abb. 62 und Abb. 64 ersichtlich. Zusätzlich wurde auch eine Detektion mit einem ELSD durchgeführt, siehe Abb. 53, Abb. 55, Abb. 57, Abb. 59, Abb. 61, Abb. 63 und Abb. 65.

Es zeigte sich, dass die Auftrennung der einzelnen Subfraktionen gelungen war. Die Subfraktion 2-3 wurde mit der Subfraktion 3 vereinigt, da die Konzentration der Subfraktion 2-3 sehr gering war.

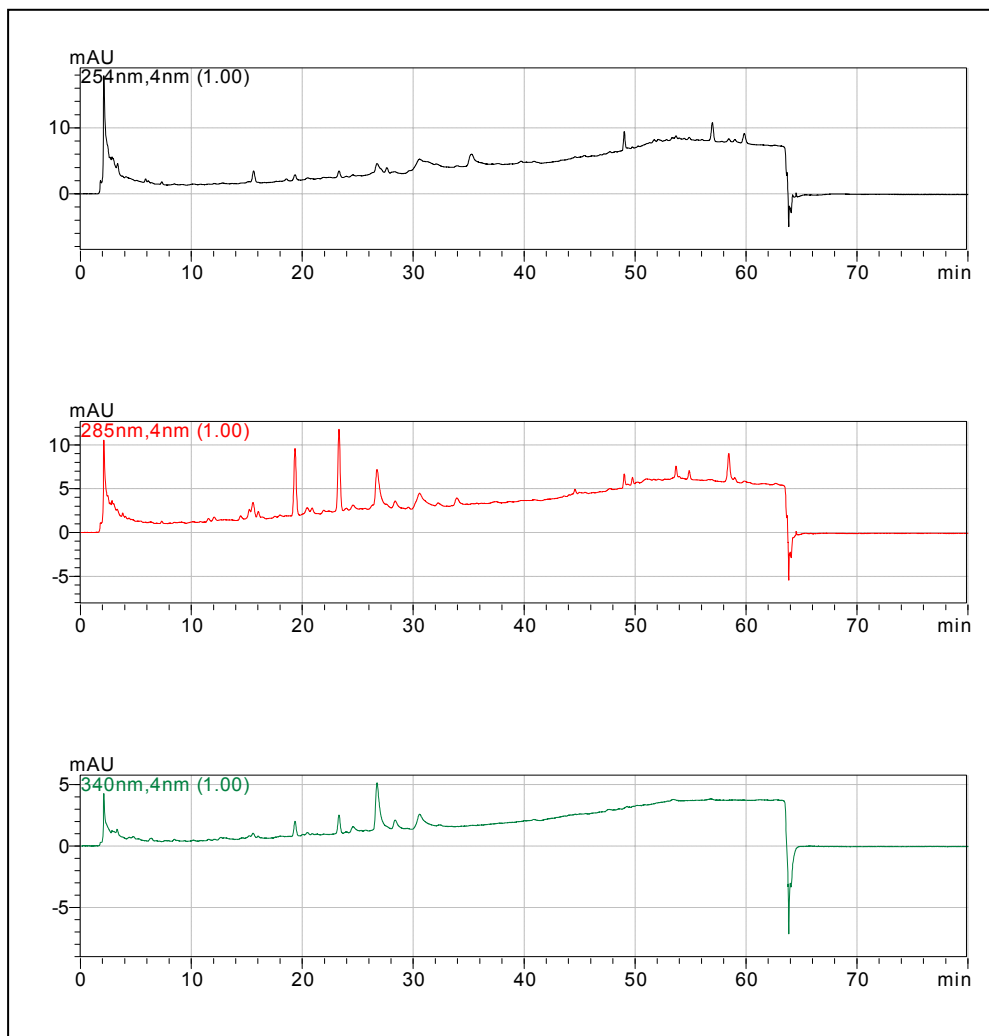


Abb. 52 HPLC Analyse der Subfraktion 1 bei verschiedenen Wellenlängen

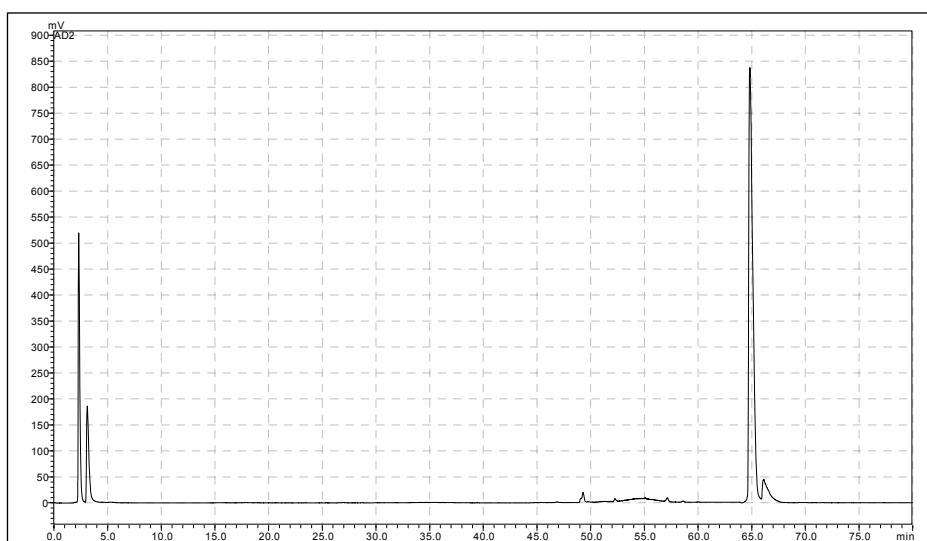


Abb. 53 ELSD-Signal der Subfraktion 1

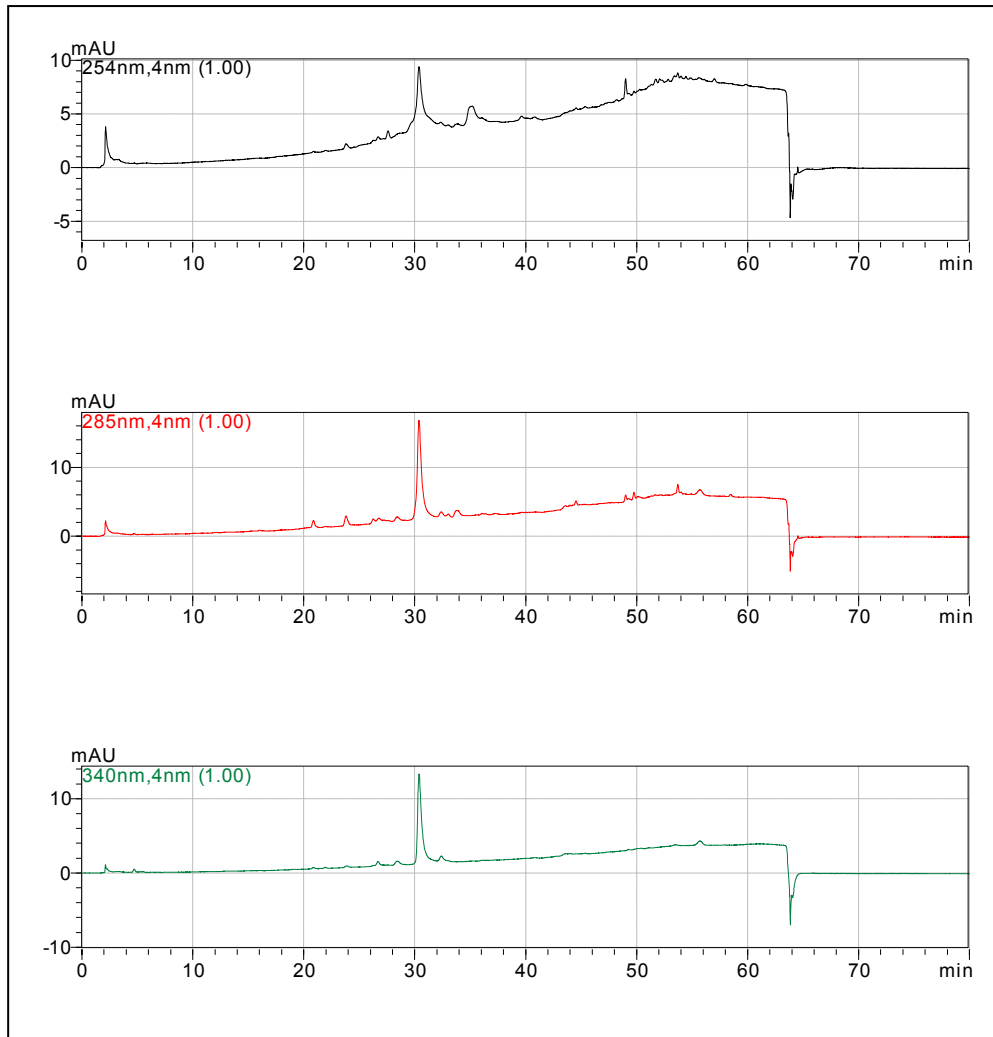


Abb. 54 HPLC Analyse der Subfraktion 2 bei verschiedenen Wellenlängen

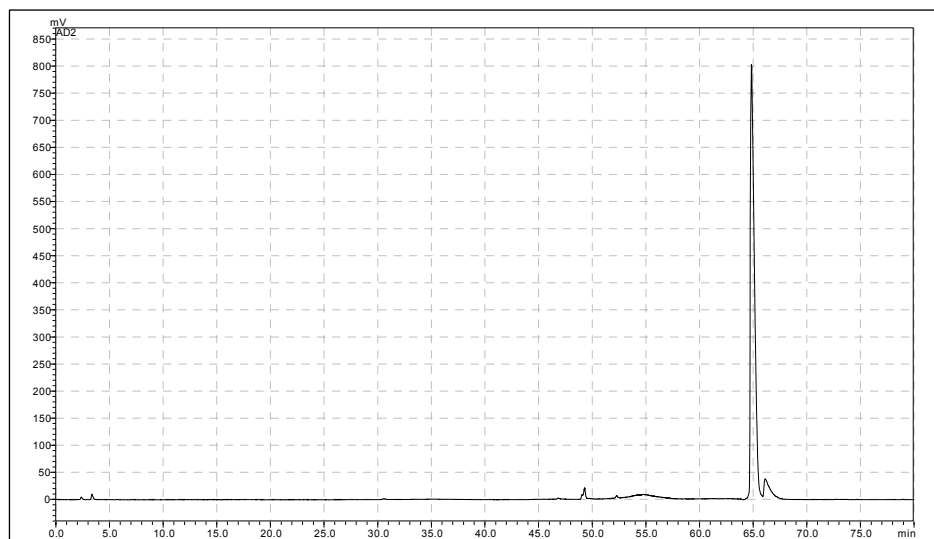


Abb. 55 ELSD-Signal der Subfraktion 2

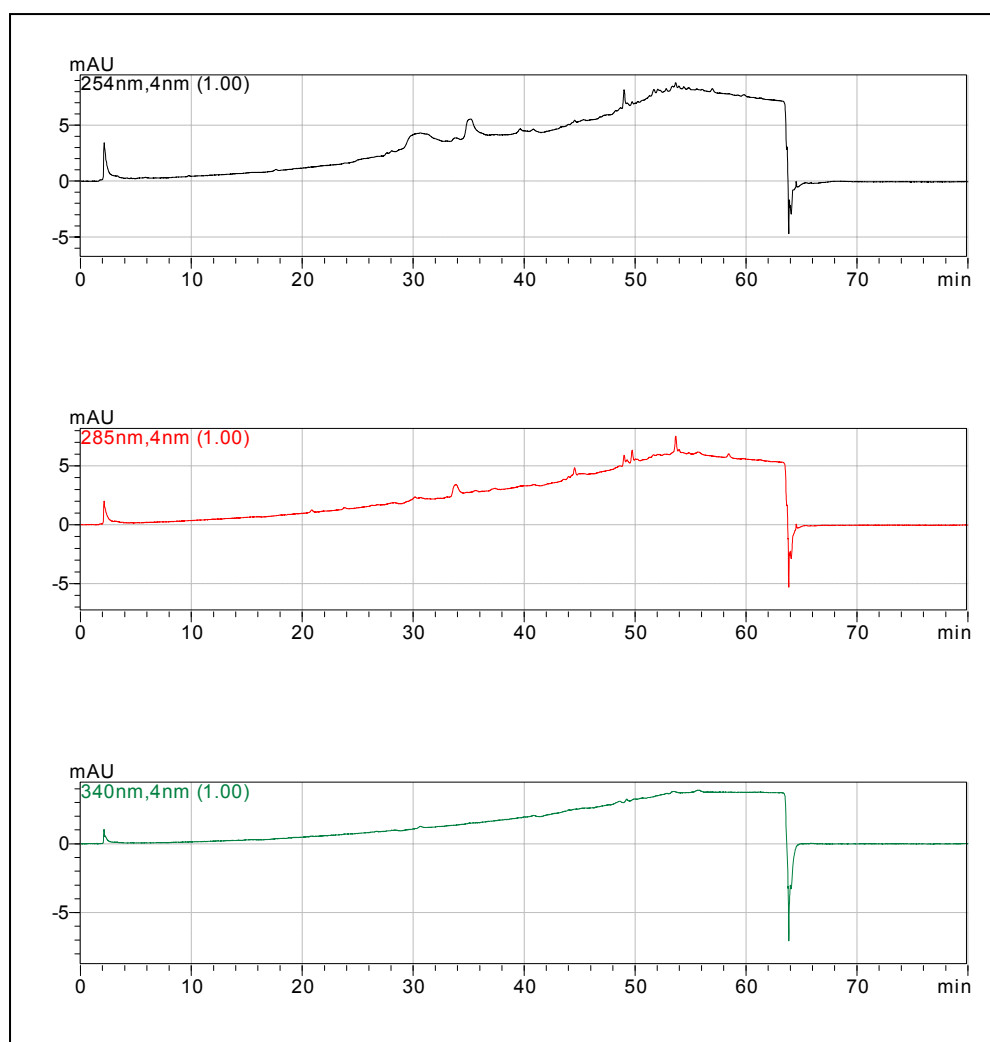


Abb. 56 HPLC Analyse der Subfraktion 2-3 bei verschiedenen Wellenlängen

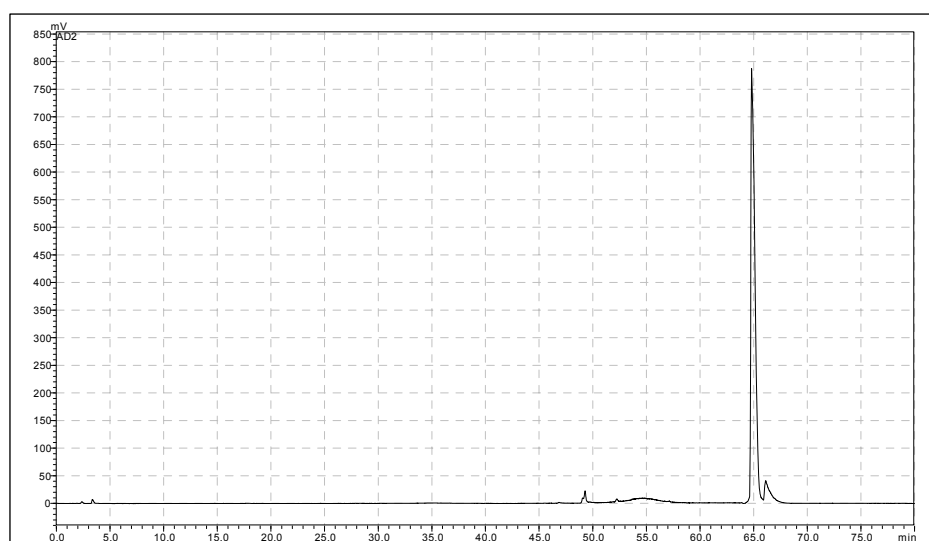


Abb. 57 ELSD-Signal der Subfraktion 2-3

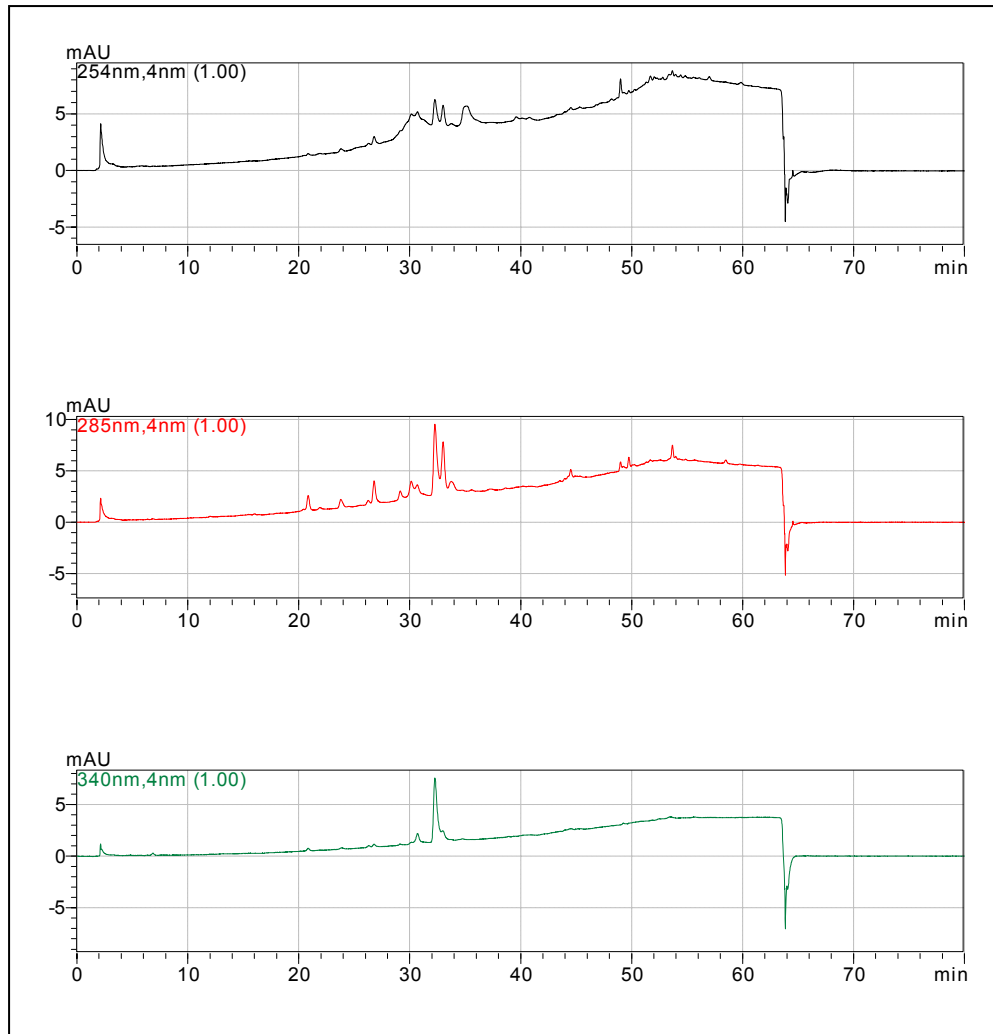


Abb. 58 HPLC Analyse der Subfraktion 3 bei verschiedenen Wellenlängen

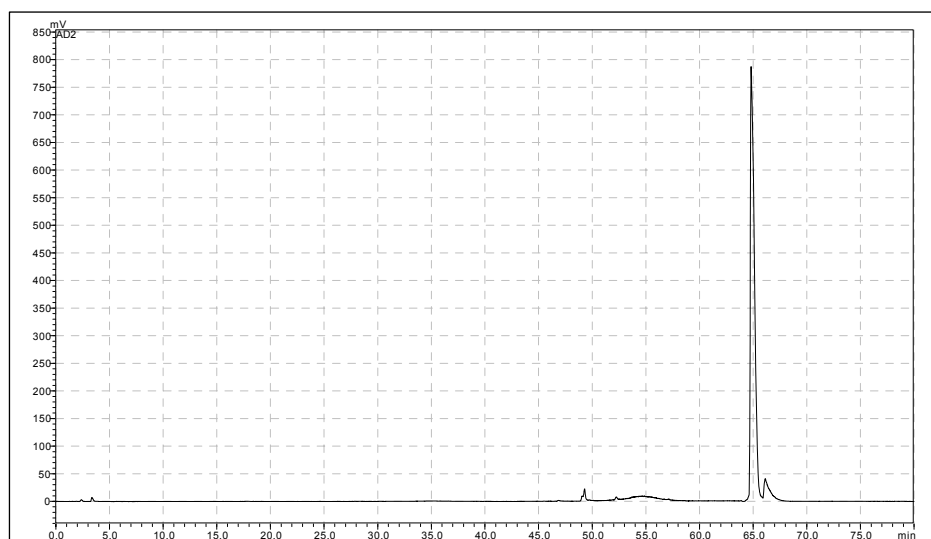


Abb. 59 ELSD-Signal der Subfraktion 3

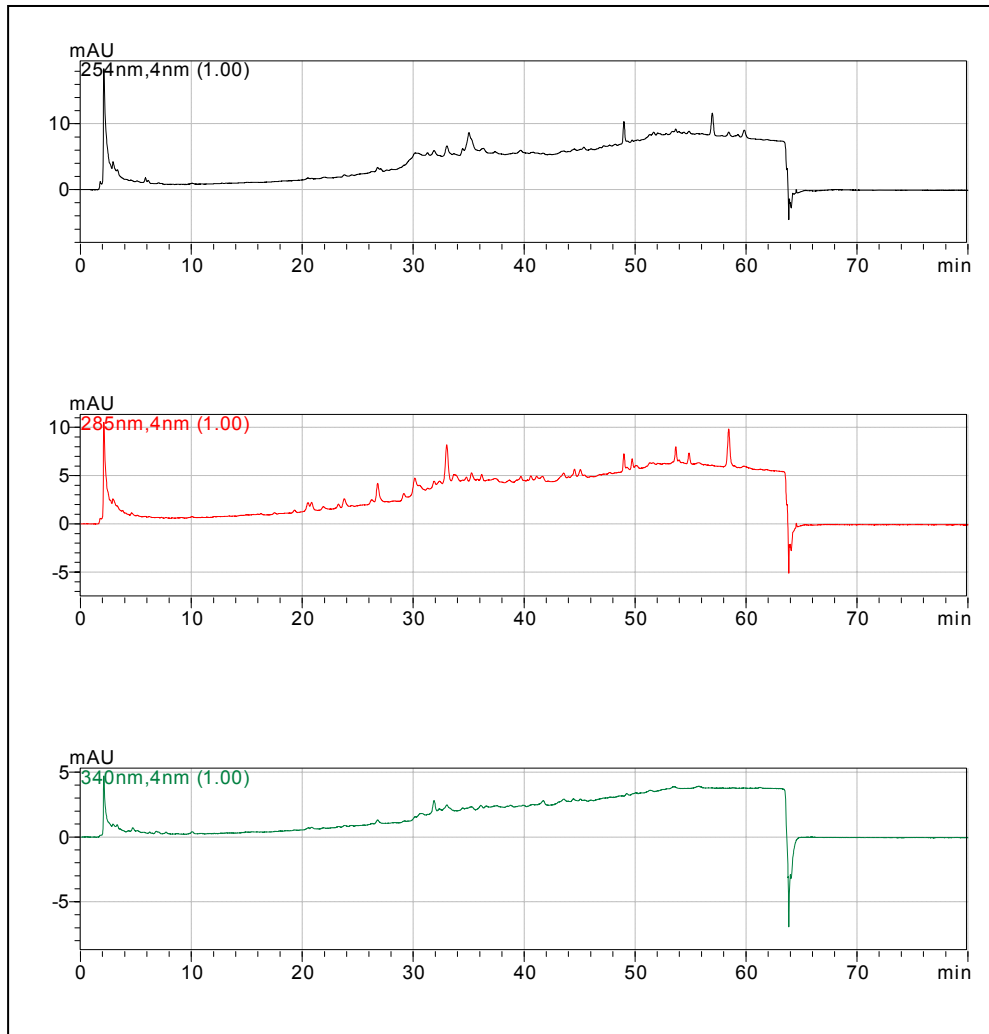


Abb. 60 HPLC Analyse der Subfraktion 4 bei verschiedenen Wellenlängen

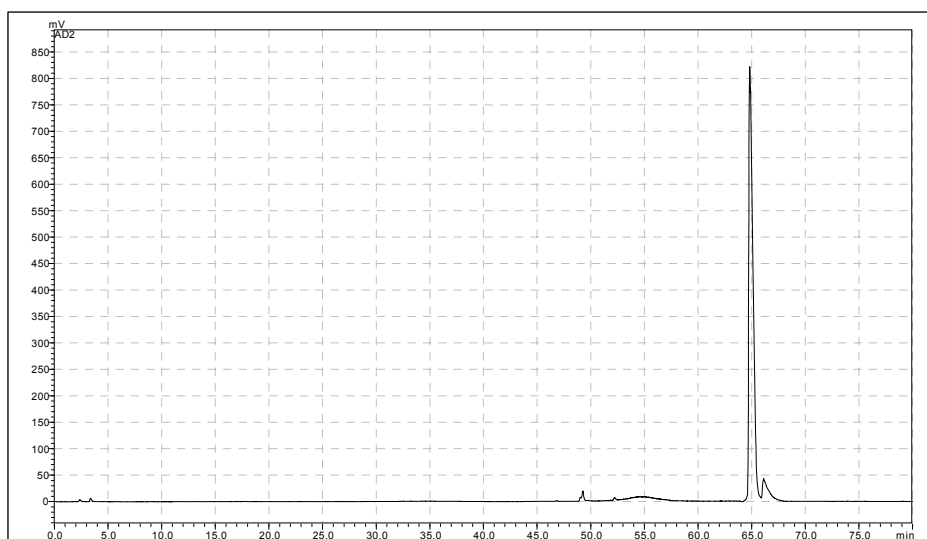


Abb. 61 ELSD-Signal der Subfraktion 4

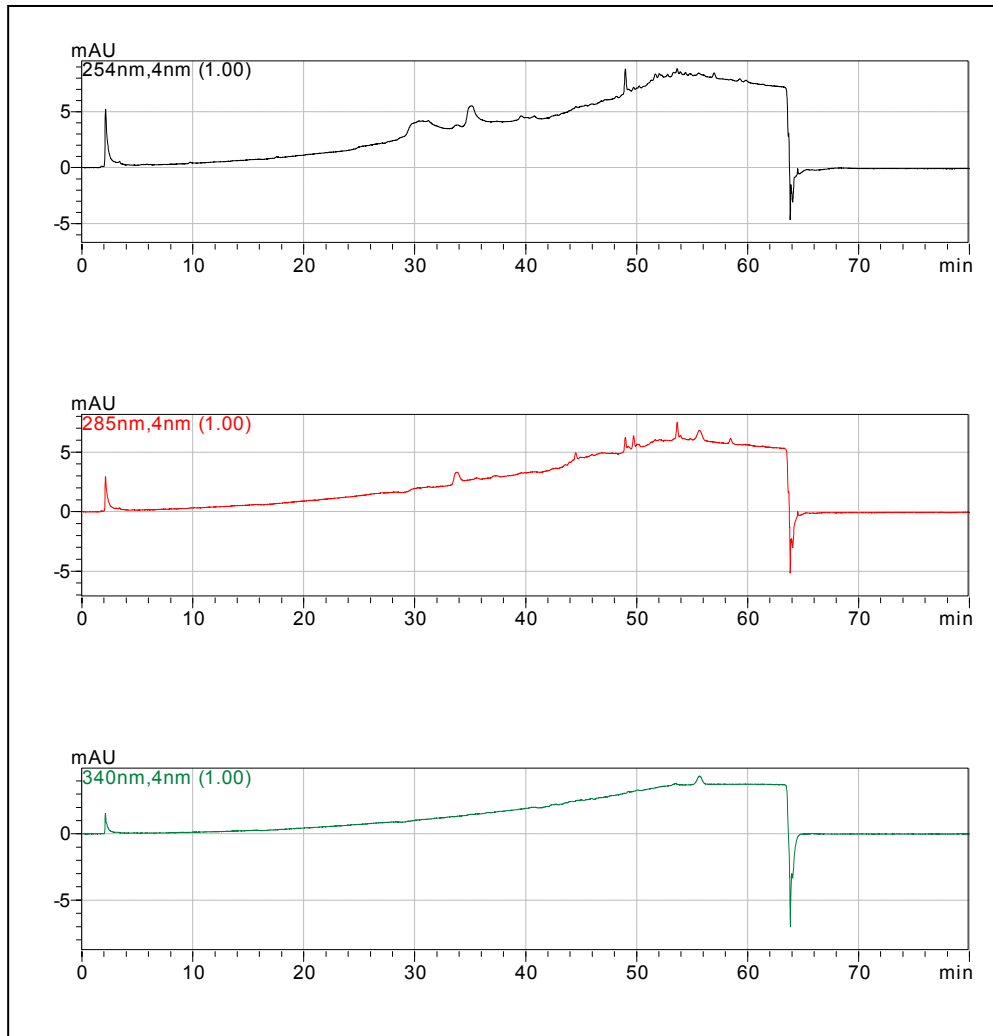


Abb. 62 HPLC Analyse der Subfraktion 5 bei verschiedenen Wellenlängen

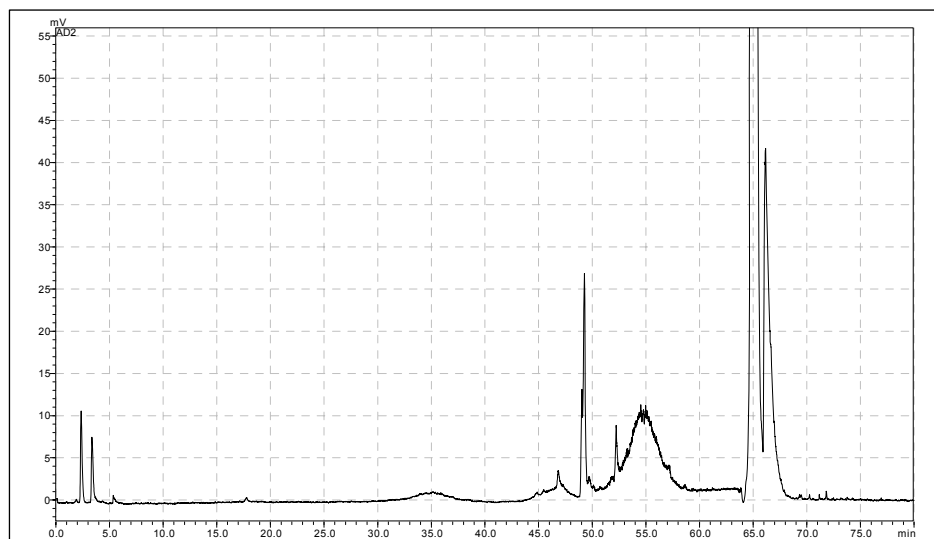


Abb. 63 ELSD-Signal der Subfraktion 5

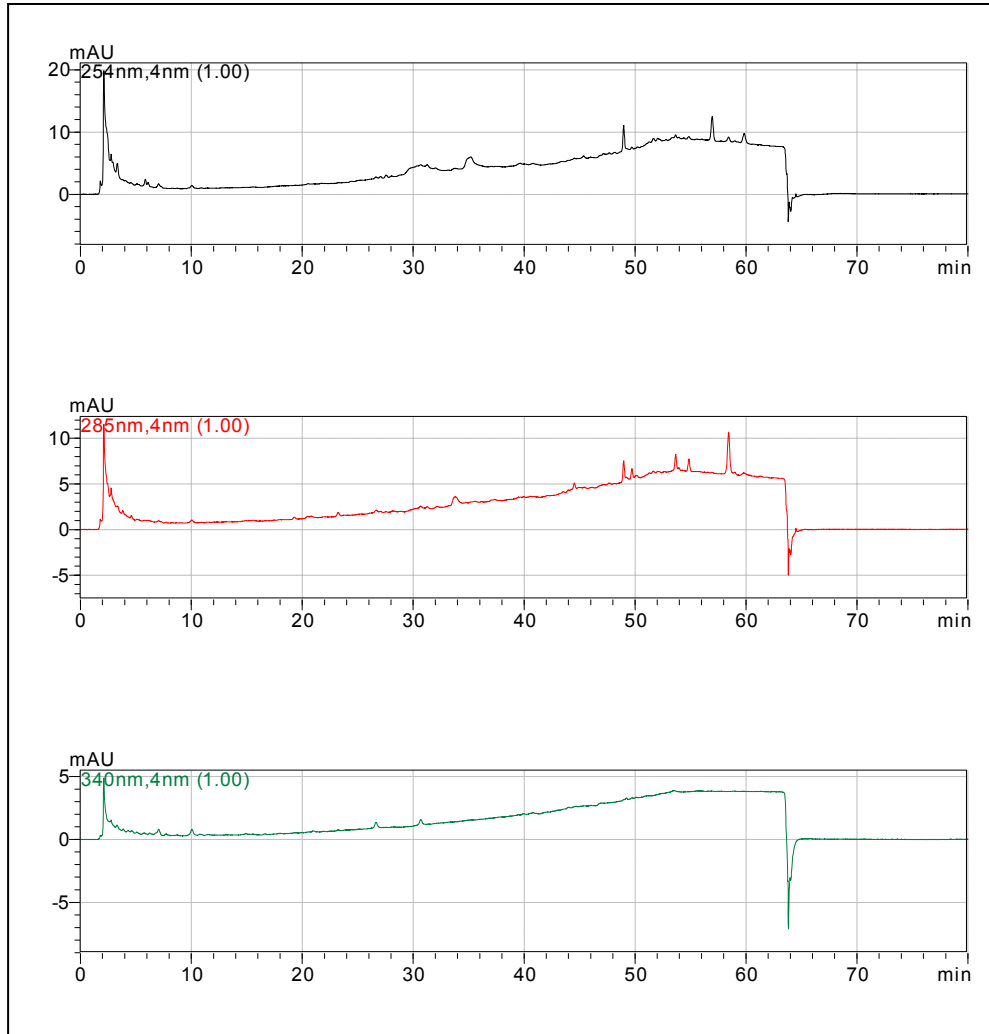


Abb. 64 HPLC Analyse der Subfraktion 6 bei verschiedenen Wellenlängen

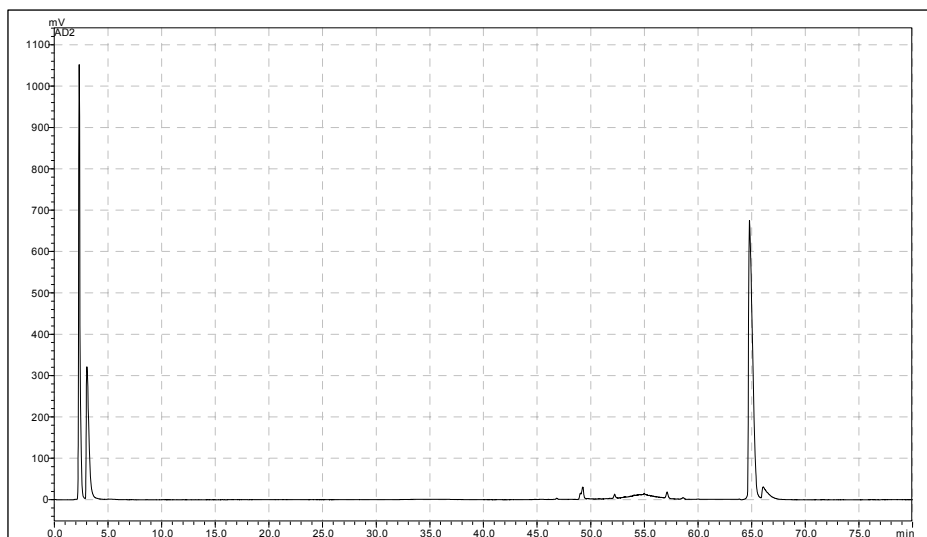


Abb. 65 ELSD-Signal der Subfraktion 6

Für die Durchführung der Zelltests zur Überprüfung der Aktivität wurden die einzelnen Subfraktionen mittels Speed-Vac wieder zur Trockene gebracht und deren Ausbeute bestimmt. Zusätzlich wurde noch ein Probengefäß mit 100 % MeOH-Extrakt und einem Leerwert (entsprechende Menge Lösungsmittel, zur Trockene gebracht) eingewogen, die genauen Werte sind in Tab. 14 zusammengefasst:

Substanz	Ausbeute
100 % MeOH-Extrakt	1,97 mg
Subfraktion 1	3,30 mg
Subfraktion 2	0,82 mg
Subfraktion 3	1,12 mg
Subfraktion 4	4,17 mg
Subfraktion 5	0,74 mg
Subfraktion 6	4,09 mg
Leerwert	0,15 mg

Tab. 14 Inhalte der zu untersuchenden Substanzen

Mit diesem Ausgangsmaterial konnten die pharmakologischen Untersuchungen gestartet werden, diese sind im nächsten Kapitel näher beschrieben.

5. Pharmakologische Testung der Subfraktionen

Hier wurden die Subfraktionen und das 100 % MeOH-Gesamtextrakt mittels Luciferase-Zelltest auf antiphlogistische Wirkung getestet. Bei diesem Zelltest wurde die Rezeptoraktivierung von PPAR (Peroxisomen-Proliferator-aktivierter-Rezeptor) und die Rezeptor-inhibierung von NFκB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).

Die Parameter des Zelltests wurden bereits in Kapitel 3.7 und in Tab. 12 beschrieben.

5.1 PPAR

Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor gehört zu der Familie der nukleären Rezeptoren. Sie bilden zusammen mit dem Retinoid X-Rezeptor Heterodimere aus, die im Zellkern an bestimmte DNA-Responseelemente in Genpromotoren binden und die Expression der entsprechenden Gene steuern.

Es existieren 3 Typen:

PPARα: wird vor allem in der Leber exprimiert und durch ungesättigte Fettsäuren und Fibrate aktiviert. PPARα Aktivierung steigert die Expression vieler am Fettsäure-Metabolismus beteiligter Enzyme und führt dadurch zur Senkung des Triglycerid-Plasmaspiegels.

PPARβ: kommt im Organismus ubiquitär vor. Vitamin A-Säure und verschiedene Eicosanoide wie Prostacyclin konnten als Aktivatoren identifiziert werden.

PPARγ: wird vorwiegend in Adipocyten exprimiert und durch Eicosanoide und Thiazolidindione (Glitazone) aktiviert. PPARγ-Aktivierung führt zu Lipidsenkung und Adipocyten-Differenzierung und erhöht die Empfindlichkeit peripherer Gewebe für Insulin [6].

Kürzlich wurde herausgefunden, dass PPAR γ eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielt. PPAR γ soll die Fähigkeit besitzen, die Expression von inflammatorischen Zytokinen zu hemmen und die Differenzierung von Zellen des Immunsystems in Richtung anti-entzündlicher Phänotypen zu lenken [14].

5.2 NF κ B

Nuklear Faktor- κ B ist ein ubiquitär vorkommender Transkriptionsfaktor, der für die Expression von Genen bei der Immunantwort, bei der Differenzierung und Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Eine Falschregulierung des NF κ B kann zu Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und Krebs führen.

Derzeit sind 5 Untereinheiten von NF κ B bekannt:

- NF κ B1 (auch als p50 bezeichnet)
- NF κ B2 (p52)
- RelA (p65)
- RelB
- c-Rel

NF κ B kann durch eine Vielzahl von Reizen aktiviert werden, wie z.B. durch Zytokine (wie TNF α und IL-1), T- und B-Zell Mitogene, virale Proteine und Stress-Induktoren (wie reaktive Sauerstoff-Spezies oder UV-Strahlung). NF κ B wird im Zytoplasma von I κ B inhibiert. Durch das Aktivierungssignal (z.B. Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor) kann eine Phosphorylierung von I κ B, durch IKK (I κ B Kinase-Komplex) stattfinden. Das regelt den Abbau des I κ B durch das Ubiquitin System, indem das Zielmolekül durch eine Ubiquitin-Kette markiert wird und zum Abbau durch 26S-Proteasomen führt. Der freie NF κ B gelangt dann in den Zellkern und aktiviert die Transkription. Der Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert die Aktivität bestimmter Gene, so dass Entzündungsfaktoren produziert werden [15].

5.3 PPAR-Test

Es wurde eine Kultivierung der HEK-293T-Zellen nach standardisierten Methoden durchgeführt. Als Nährmedium verwendete man Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Die Supplementierung erfolgte mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS, fetale bovine serum), Penicillin-Streptomycin und Glutamin. Dann wurden die Zellen bei 37°C, 5 % CO₂-Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, bis zur Konflueszenz. Als die Konflueszenz zwischen 60 % und 70 % betrug wurden die Zellen mit PPRE-tk3x-Luc und pEGFP-C1 transfiziert und erneut inkubiert. Die Übertragung der Zellen auf Mikrotiterplatten (96-well-plate) erfolgte nach 6 Stunden. Dabei wurde auch das Medium (DMEM mit 5 % FBS) gewechselt. Nach einer Stunde wurden die zu untersuchenden Substanzen aufgetragen und für weitere 18 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, lysiert und vermessen. Von einer PPAR-Aktivierung kann gesprochen werden, wenn das Signal mehr als 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe gestiegen ist [7].

5.4 NFκB-Test

Hier wurden HEK-293-Zellen wie schon oben erwähnt kultiviert. Bei einer Konflueszenz zwischen 60 % und 70 % wurden die Zellen mit pNFκB-Luc und pEGFP-C1 transfiziert und erneut inkubiert. Sechs Stunden später erfolgte die Übertragung der Zellen auf Mikrotiterplatten (96-well-plate), dann wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag fand ein Wechsel des Mediums (serumfreies DMEM) statt. Danach wurden die zu untersuchenden Substanzen aufgetragen. Eine Stunde danach wurden die Zellen mit einem Tumornekrosefaktor (TNF-α) über 6 Stunden stimuliert. Am Ende wurde wieder gewaschen, lysiert und vermessen. Von einer NFκB-Inhibierung kann gesprochen werden, wenn das Signal mehr als 50 % gehemmt wird [7].

5.5 Auswertung der Messungen

In Tab. 15 sind die Ergebnisse der Zelltests zusammengefasst. Alle Subfraktionen wurden in einer Konzentration von 5µl/ml getestet. Beim 100 % MeOH-Extrakt lag die Inhibierung von NFκB unter 50 %, daher ist sie als „negativ“ bewertet worden. Aber es kam zu einer Aktivierung von PPARα und PPARγ. Leider gab es bei allen Subfraktionen keine signifikante Inhibierung oder Aktivierung, was möglicherweise auf zu geringe Substanzkonzentrationen zurückzuführen ist.

Proben	Inhibierung von NFκB	Aktivierung von PPARα	Aktivierung von PPARγ
100 % MeOH Extrakt	NEIN	(1) 55 % (2) 107 %	(1) 73 % (2) 64 % (3) 64 % (4) 75 %
Subfraktion 1	NEIN	NEIN	NEIN
Subfraktion 2	NEIN	NEIN	NEIN
Subfraktion 3	NEIN	NEIN	NEIN
Subfraktion 4	NEIN	NEIN	NEIN
Subfraktion 5	NEIN	NEIN	NEIN
Subfraktion 6	NEIN	NEIN	NEIN
Leerwert	NEIN	NEIN	NEIN

Tab. 15 Ergebnisse der pharmakologischen Untersuchung

In Abb. 66 und Abb. 67 sind die Ergebnisse des Zelltests bei der Aktivierung von PPAR α und PPAR γ graphisch dargestellt. Es wurden bei PPAR α zwei und bei PPAR γ vier voneinander unabhängige Messungen durchgeführt.

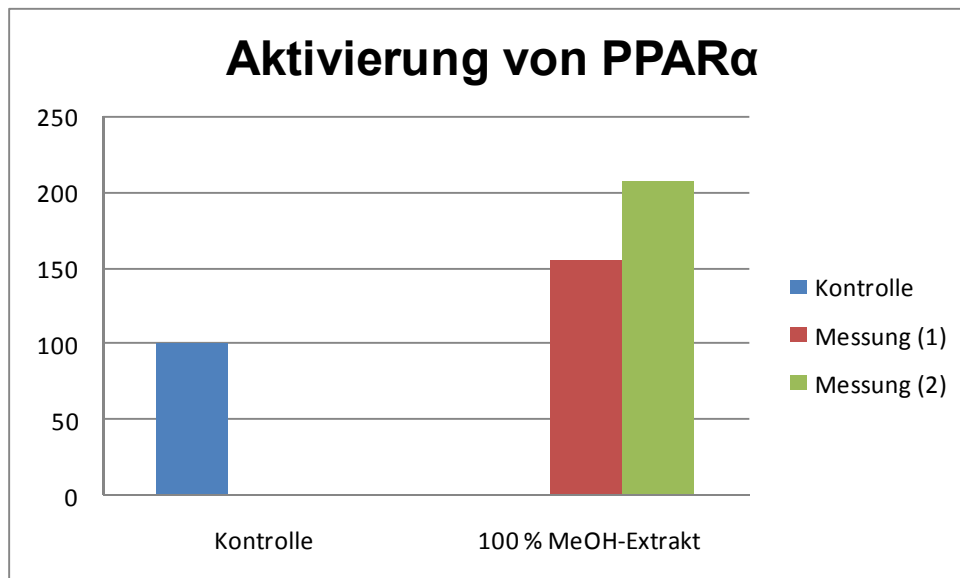


Abb. 66 Graphische Darstellung der pharmakologischen Untersuchungen (Aktivierung von PPAR α)

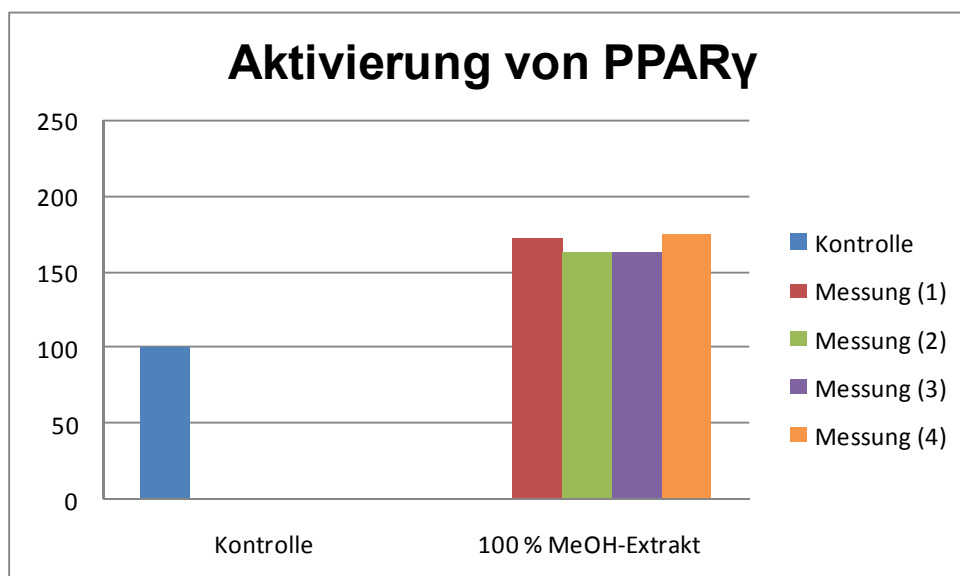


Abb. 67 Graphische Darstellung der pharmakologischen Untersuchungen (Aktivierung von PPAR γ)

6. Ergebnisse und Diskussion

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die 100 % MeOH-Fraktion, auf die man sich vorwiegend in dieser Arbeit konzentrierte, eine gute antiphlogistische Wirkung im Zelltest zeigt. Beim Gesamtextrakt kam es zu einer Aktivierung von PPAR α und PPAR γ , aber zu keiner Inhibierung von NF κ B. Bei den Subfraktionen zeigten sich keine Ergebnisse, die auf eine antiphlogistische Wirksamkeit hindeuten könnten. Dies könnte die Ursache haben, dass eine zu geringe Konzentration vorlag. Eine Möglichkeit wäre es, die Subfraktionen wieder miteinander zu vereinigen und erneute pharmakologische Untersuchungen durchzuführen, um die ursprünglichen Ergebnisse zu bestätigen.

Bezüglich Wirkstoff-Identifizierung konnte durch Analyse mit LC-MS herausgefunden werden, dass sehr viele Phloroglucinole in der 100 % MeOH-Fraktion vorliegen. Es wurden von den dominantesten Peaks Strukturvorschläge gemacht, dabei zeigte sich, dass diese Verbindungen bereits bekannt sind.

Bei der GC-MS Analyse zeigte sich, dass die 100 % MeOH-Fraktion viele langkettige Fettsäuren und Fettsäure-Derivate enthält. Für derartige Verbindungen ist eine antiphlogistische Wirkung in zahlreichen Publikationen belegt.

7. Zusammenfassung

Diese Diplomarbeit beschäftigt sich mit der Analytik und Testung der Fraktionen von *Dryopteris filix-mas*.

Zu Beginn wurde eine sehr große Menge an Dichlormethanextrakt hergestellt, um genügend Ausgangsmaterial für die entsprechenden Versuche zu gewährleisten. Das erhaltene Dichlormethanextrakt wurde durch Chlorophyll-Abtrennung gereinigt. Das gereinigte Extrakt wurde dann mittels Festphasenextraktion fraktioniert, wodurch man eine 30 %, 70 % und 100 % MeOH-Fraktion erhielt. Die 100 % MeOH-Fraktion wurde dann zur weiteren Fraktionierung und Charakterisierung herangezogen. Es erfolgte eine Überprüfung des Inhaltsstoffmusters mittels analytischer HPLC, GC-MS und LC-MS. Dabei zeigte sich, dass in der 100 % MeOH-Fraktion viele Fettsäuren und Phloroglucinole vorkommen. Mittels präparativer HPLC wurde die Gesamtfraktion noch in 6 weitere Fraktionen unterteilt. Diese Subfraktionen wurden ebenfalls mit analytischer HPLC überprüft und in weiterer Folge mit dem Luciferase-Zelltest auf ihre antiphlogistische Wirkung untersucht. Dabei wurde auf die Inhibierung von NF κ B und auf die Aktivierung von PPAR α und PPAR γ getestet. Es zeigte sich, dass das Gesamtextrakt eine Aktivierung von PPAR α und von PPAR γ verursachte, d.h. das Signal stieg um mehr als 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe an. Leider kam es beim Gesamtextrakt zu keiner signifikanten Inhibierung von NF κ B. D.h. hierbei lag die Inhibierung unter 50 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Auch die Subfraktionen zeigten keine signifikante Aktivierung oder Inhibierung.

Damit konnte gezeigt werden, dass die 100 % MeOH-Fraktion in entsprechenden Zelltests gute antiphlogistische Wirkung besitzt, jedoch konnten leider keine einzelnen Inhaltsstoffe, die eventuell für die antiphlogistische Wirkung verantwortlich sind, bestimmt werden.

8. Abstract

This diploma thesis deals with the analysis and testing of fractions of *Dryopteris filix-mas*.

In the beginning a large amount of dichlormethanextract was produced to provide enough basic material for further fractionation and for the corresponding tests. The gained dichlormethanextract was cleaned using chlorophyll-separation. The cleaned extract was fractionated by solid phase extraction (SPE) resulting in a 30 %, a 70 % and a 100 % MeOH fraction. The 100 % fraction was then used for further fractionation and characterization. A verification of the substances was performed using analytical methods like HPLC, GC-MS, LC-MS. It could be shown that in the 100 % fraction many fatty acids and phloroglucinols are present. Using preparative HPLC the total fraction was divided into six sub-fractions. These sub-fractions then again were tested using analytical HPLC and furthermore investigated on their anti-inflammatory effect using the luciferase-celltest. Especially the inhibition of NF κ B and the activation of PPAR α and PPAR γ have been investigated. It turned out, that the total fraction caused activation of PPAR α and PPAR γ , i.e. that the signal raised more than 50 % with respect to the non-treated control group. Unfortunately the total fraction showed no significant inhibition of NF κ B at all, the corresponding value was below 50 % in comparison with the non-treated control group. Furthermore, the sub-fractions did not show any significant activation or inhibition either.

Finally it could be shown, that the 100% MeOH-Fraction shows a good anti-inflammatory effect in corresponding cell tests. Unfortunately it was not possible to identify individual substances, which are mainly responsible for the anti-inflammatory effect.

9. Literaturverzeichnis

- [1] Hänsel R. Keller K. Rimpler H. Schneider G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis Band 4, 5. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. 1992; Seite 1200-1207
- [2] Gerlach S. (2007), Wissenschaftliche Reflexionen über traditionelle Arzneimittel in Österreich, Dissertation, Universität Wien
- [3] Adam K. Becker H. Analytik biogener Arzneistoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. 2000;
- [4] Abb. 1:
<http://www.dkimages.com/discover/previews/940/55012881.JPG>
Zugriff am: 26.07.2009, 18:55
- [5] Abb. 2:
<http://www.fugleognatur.dk/gallery.asp?mode=ShowLarge&ID=66246>
Zugriff am: 26.07.2009, 18:55
- [6] Ammon H.P.T. Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch 9. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin New York. 2004; Seite 1145
- [7] Huber K. (2009), Screening verschiedener Farnextrakte auf Rezeptoraktivierung von PPAR α , PPAR γ und auf Rezeptorinhibierung von NF κ B, Diplomarbeit, Universität Wien
- [8] Sommergruber M. (2007), *Dryopteris filix-mas* – phytochemische und pharmakologische Untersuchungen, Diplomarbeit, Universität Wien
- [9] Richter G. Praktische Biochemie Grundlagen und Techniken, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York. 2003; Seite 234-235
- [10] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/biokatalyse_enzyme/chemilumineszenz.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/biokatalyse/luci_assay.vscml.html
Zugriff am: 06.10.2009, 16:16
- [11] Wagner H. Bladt S. Zgainski E.M. Drogenanalyse, Dünnschichtchromatographische Analyse von Arzneidrogen. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 1983; Seite 282
- [12] Widén C.J., Pyysalo H. und Reichstein T. Fast-Atom-Bombardment Mass Spectra of Phloroglucinols from *Dryopteris* Ferns. Helvetica Chimica Acta-Vol. 77 (1994). Seite 1985-1998

- [13]Widén C.J., Vida G., von Euw J. und Reichstein T. Die Phloroglucide von *Dryopteris villarii* (Bell.) Woynar und anderer Farne der Gattung *Dryopteris* sowie die mögliche Abstammung von *D. filix-mas* (L.) Schott. Helvetica Chimica Acta-Vol. 54, Fasc.8 (1971) – Nr. 305. Seite 2824-2857
- [14]Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. The New Zealand Institute for Plant & Food Research Limited (27. Juni 2009). Abstract
- [15]<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch4H3.htm>
Zugriff am: 07.03.2010, 18:19
- [16]Rotter-le Beau T. (2008), Vergleichende phytochemische Untersuchungen an Farnen, Diplomarbeit, Universität Wien
- [17]Ritter N. (2008), Isolierung von Wirkstoffen aus *Dryopteris filix-mas*, Diplomarbeit, Universität Wien

Curriculum Vitae

Persönliche Daten	
Name	Katharina Dvorak
e-Mail	katharina.dvorak@gmx.at
Geburtsdatum	18. Februar 1981
Geburtsort	Oberpullendorf
Staatsangehörigkeit	Österreich
Ausbildung	
WS 2002 – SS 2010	Studium der Pharmazie an der Universität Wien
Juni 2002	Matura mit gutem Erfolg an der Höheren Lehranstalt für Mode und Bekleidungstechnik Michelbeuern, Wien
Berufserfahrungen	
2008 – 2010	St. Severinus Apotheke
2004 – 2008	Apotheke „Zum Feldmarschall Radetzky“